



**CARACTERIZAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES
MORFO-ANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS,
EM CICLOS DE SELEÇÃO DO MILHO
SARACURA, PARA TOLERÂNCIA AO
ENCHARCAMENTO DO SOLO**

FABRICIO JOSÉ PEREIRA

LAVRAS-MG

2008

FABRICIO JOSÉ PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES MORFO-
ANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS, EM CICLOS DE
SELEÇÃO DO MILHO SARACURA, PARA
TOLERÂNCIA AO ENCHARCAMENTO DO SOLO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia-Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de mestre.

Orientador
Professor Dr. Evaristo Mauro de Castro

MINAS GERAIS – BRASIL

2008

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

Pereira, Fabrício José.

Caracterização das modificações morfo-anatômicas e bioquímicas,
em ciclos de seleção do milho saracura, para tolerância ao
encharcamento do solo / Fabrício José Pereira. – Lavras : UFLA, 2008.
78 p. : il.

(Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Evaristo Mauro de Castro

Bibliografia.

1. Milho saracura. 2. Anatomia. 3. Estresse oxidativo. 4. Invetases. 5.
Aerênquimas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.153

FABRICIO JOSÉ PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES MORFO-
ANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS, EM CICLOS DE
SELEÇÃO DO MILHO SARACURA, PARA
TOLERÂNCIA AO ENCHARCAMENTO DO SOLO**

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

APROVADA em 28 de julho de 2008.

Dr. Marcelo Polo

Unifal-MG

Dr. Paulo César Magalhães (Co-orientador)

Embrapa Milho e Sorgo

Dr. Antônio Chalfun Jr.

UFLA

Dr. Evaristo Mauro de Castro

Orientador

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

Primeiro, a Deus, por possibilitar tudo o que vivemos e por guiar nossas ações e nos dar força para prosseguir.

A minha esposa, Andréa e ao meu filho, Thales, principais motivadores de minha vida e da minha luta.

Aos meus pais, José Nicodemos e Catarina, pelo incentivo e ajuda em momentos difíceis, e ao meu irmão, Fabio e minhas irmãs, pelo apoio e auxílio.

Ao professor Dr. Evaristo Mauro de Castro, pela orientação, oportunidades e amizade, imprescindíveis para a realização deste trabalho e cuja amizade e profissionalismo contribuíram para meu desenvolvimento profissional.

Ao Dr. Paulo César Magalhães, pela confiança, apoio e amizade.

Ao Dr. Marcelo Pólo, pela amizade, orientação e minha iniciação no ambiente acadêmico e de pesquisa.

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA, Luis Edson, Amauri, Chalfun, Renato, Donizete e todos os outros e aos técnicos e funcionários, que não se limitam às disciplinas, mas cuja boa vontade os coloca sempre à disposição para nos ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
pela bolsa de mestrado.

Aos colegas do Setor de Fisiologia Vegetal, pela convivência e amizade.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	02
2.1 A variedade Saracura BRS-4154.....	02
2.2 Catalase.....	03
2.3 Guaiacol Peroxidase.....	04
2.4 Ascorbato Peroxidase.....	05
2.5 Pepsase.....	06
2.6 Invertases e açúcares.....	06
2.7 Anatomia.....	07
2.8 Referências Bibliográficas.....	08
3 CAPÍTULO 1: Ciclos de seleção podem melhorar a formação de aerênquimas e outros atributos radiculares do milho ‘Saracura BRS 4154’ para a tolerância ao alagamento.....	10
3.1 Resumo.....	11
3.2 Abstract.....	12
3.3 Introdução.....	13
3.4 Material e Métodos.....	14
3.5 Resultados e Discussão.....	17
3.6 Conclusões.....	27
3.7 Agradecimentos.....	27
3.8 Referências Bibliográficas.....	27

4 CAPÍTULO 2: Otimização da estrutura e função das folhas de milho 'Saracura BRS-4154' oriundas de sucessivos ciclos de seleção submetidos ao alagamento do solo.....	30
4.1 Resumo.....	31
4.2 Abstract.....	32
4.3 Introdução.....	33
4.4 Material e Métodos.....	34
4.5 Resultados e Discussão.....	36
4.6 Conclusões.....	49
4.7 Agradecimentos.....	49
4.8 Referências Bibliográficas.....	49
5 CAPÍTULO 3: Influência de ciclos de seleção milho (Zea mays L.) 'Saracura BRS-4154' na atividade de enzimas antioxidativas das raízes.....	52
5.1 Resumo.....	53
5.2 Abstract.....	54
5.3 Introdução.....	55
5.4 Material e Métodos.....	56
5.5 Resultados e Discussão.....	58
5.6 Conclusões.....	63
5.7 Agradecimentos.....	63
5.8 Referências Bibliográficas.....	64
6 CAPÍTULO 4: Metabolismo do carbono nas raízes de milho (Zea mays L.) cultivar Saracura BR-4154 de sucessivos ciclos de seleção sob diferentes regimes de alagamento.....	66
6.1 Resumo.....	67
6.2 Abstract.....	68

6.3 Introdução.....	69
6.4 Material e Métodos.....	70
6.5 Resultados e Discussão.....	72
6.6 Conclusões.....	76
6.7 Agradecimentos.....	77
6.8 Referências Bibliográficas.....	77

RESUMO GERAL

PEREIRA, Fabricio José: **Caracterização das modificações morfo-anatômicas e bioquímicas, em ciclos de seleção do milho saracura para a tolerância ao encharcamento do solo.** 2008. 78 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras¹.

O alagamento é um problema que afeta grandes áreas. No Brasil este tipo de estresse representa cerca de 28 milhões de hectares de potencial para a agricultura. O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de grande importância para a alimentação e como matéria-prima para outros produtos, sendo uma espécie reconhecidamente sensível a condições de hipoxia, dificultando a sua produção em locais sujeitos a este estresse. Para contornar este problema, a Embrapa Milho e Sorgo desenvolveu, durante 9 anos, uma variedade denominada Saracura BRS-4154, lançada em 1997 e atualmente no 18º ciclo, cujas características fisiológicas e morfológicas conferem tolerância ao alagamento intermitente. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar possíveis alterações na anatomia e na bioquímica das plantas de milho Saracura, de amostras dos 18 ciclos de seleção sucessivos, submetidas ao alagamento intermitente. Foram avaliadas as atividades de enzimas do metabolismo oxidativo: peroxidase do ascorbato e guaiacol, catalase e pepsase e o metabolismo do carbono com a avaliação das isoformas da invertase e os teores de açúcares redutores e açúcares solúveis totais. Morfológicamente, a anatomia quantitativa foi avaliada nas raízes e nas folhas das plantas sob microscopia óptica, mensurando a espessura dos diferentes tecidos, a formação de aerênquima, as alterações nas áreas relativas, o tamanho celular, os vasos do xilema, a densidade estomática, o índice estomático, para verificar possíveis alterações e suas relações de estrutura e função. A análise das enzimas demonstrou que houve alterações nas enzimas antioxidativas em relação aos diferentes ciclos de seleção e ao nível de estresse aplicado com o favorecimento das peroxidases em relação à catalase e do favorecimento da invertase neutra do citosol como enzima de clivagem da sacarose. Ocorreu, ainda, acúmulo de açúcares redutores,

¹ Orientador: Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro, Universidade Federal de Lavras.
Co-Orientador: Dr. Paulo César Magalhães, Embrapa Milho e Sorgo.

possivelmente relacionados à sua utilização como substrato para o metabolismo energético em compensação da menor energia produzida por anaerobiose. Anatomicamente, as plantas exibiram alterações nas raízes com o desenvolvimento progressivo de aerênquima ao longo dos diferentes ciclos existindo um ganho substancial em área destinada a aerênquimas nos últimos ciclos, além de alterações nos demais tecidos. Nas folhas, ocorreram diferenças na espessura do mesofilo, na densidade estomática e em outras características dos estômatos e nos feixes vasculares. Estas alterações são, provavelmente, relacionadas à manutenção do CO₂ captado e a otimização da fotossíntese e condução de água e fotossintatos. Dessa forma, pode-se observar a influência dos diferentes ciclos de seleção nas características bioquímicas e anatômicas das plantas de milho Saracura, desenvolvendo adaptações que melhoraram a adaptabilidade das plantas dos últimos ciclos seletivos para o desenvolvimento sob condições de alagamento.

GENERAL ABSTRACT

PEREIRA, Fabricio José: **Characterization of the morpho-anatomic and biochemical modifications in the selection cycles of the saracura maize to the soil flooding toleration.** 2008. 78 p. Dissertation (Master Program in Agronomy – Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras².

Flooding is a problem that affects great areas with potential to agriculture and in the Brazil could represent about 28 million ha of this areas. The maize (*Zea mays* L.) is a crop of great importance to the feeding and to prime materials to other products, and is sensible to the hipoxy conditions, difficulting it's production in areas under this stress. To escape from this problem the Embrapa Milho e Sorgo developed after 9 years the “saracura” BRS-4154 maize variety and it's physiological and morphological characteristics gives flooding tolerance, launched in 1997 and now is in it's 18th cycle. The objective of this work was to evaluate possible alterations in the anatomy and biochemistry of the saracura maize plants in samples of the 18 successive selection cycles under transient flooding. The activity of the oxidative metabolism enzymes: ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, catalase, pep carboxylase and the carbon metabolism enzymes: invertase isoforms and the reducing sugars and total soluble sugars levels were evaluated. Morphologically the quantitative anatomy were evaluated in the leaves and roots of the plants by optical microscopy, evaluating: the thickness of the tissues, the aerenchyma development, alterations in the relative areas, the size of the cells, xylem vessels, stomatal density, stomatal index, and another characteristics to verify the alterations in it's structure and function. The analysis of the enzymes shows alterations in the activity of the antioxidant enzymes along the different selection cycles and under different flooding levels, with a increase in the peroxidases against the catalase and the increase in the neutral citosol invertase to hydrolyze the

² Adviser : Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro, Universidade Federal de Lavras.
Co-adviser: Dr. Paulo César Magalhães, Embrapa Milho e Sorgo.

sucrose. Occurs yet the accumulation of the reducing sugars along the cycles and under severe stress, related to the energetic metabolism substrate to compensating the reduction on the energy production in anaerobiose. Anatomically the plants show alterations in the roots and a progressive aerenchyma development along the cycles and high gain in area of aerenchyma in the ultimate cycles and alterations in the other tissues. In the leaves the differences of the mesophyll thickness, stomatal density, and in other stomatal parameters; in the vascular tissues all the alterations to preserve the CO₂ and improve the photosynthesis, and water and photosynthate transport. This way, we could see many influence of the different selection cycles in the biochemical and anatomic characteristics of the saracura maize plants, developing adaptations that improve the plants quality in the ultimate cycles to develop in the flooding conditions.

1 INTRODUÇÃO

A grande variedade de ambientes que o planeta possui gera regiões de diferentes características quanto às suas propriedades climáticas e edáficas. Sendo assim, o regime pluvial e as características do solo, quanto à compactação, à constituição e à drenagem, podem levar à formação de áreas nas quais a água se acumula por períodos prolongados no solo e ainda aquelas que permanecem alagadas.

Solos altamente compactados, com drenagem deficiente e sujeitos a grande volume de precipitação ou a sistemas de irrigação inadequados podem levar ao acúmulo excessivo de água e, assim, às adversidades provocadas por tais condições (Alves et al., 2002).

Neste tipo de estresse, a falta de oxigênio é resultante da dificuldade de difusão de moléculas gasosas na água. A resistência à difusão da maioria dos gases na água pode ser cerca de 10.000 vezes maior do que a do ar (Vitorino et al., 2001) e, assim, a quantidade de oxigênio disponível para as raízes será menor. A deficiência de oxigênio pode resultar em hipoxia (baixa pressão de oxigênio) ou anoxia (ausência de oxigênio disponível) (Alves et al., 2002). As plantas podem ainda utilizar alterações nas vias metabólicas menos eficientes, como o metabolismo anaeróbico, que não aproveita totalmente a energia das moléculas de glicose e ainda gera produtos que podem ser tóxicos quando acumulados, como o etanol e espécies reativas de oxigênio (Scandalios, 1993).

O planeta possui, hoje, cerca de 6% de suas áreas continentais sujeitas ao alagamento temporário e, assim, aos efeitos deste estresse. No Brasil, cerca de 28 milhões de hectares são constituídos de solos em tais condições e, destes, aproximadamente 12 milhões estão na região do cerrado. Tais solos são chamados de “solos de várzea” e possuem características aluviais (Vitorino, 2001).

O milho é um exemplo de planta sensível ao estresse por anoxia (Alves et al., 2002). Em regiões sujeitas a este estresse, as plantas possuiriam baixo desempenho e apresentariam altos riscos ao produtor. Sendo assim, a Embrapa Milho e Sorgo desenvolveu uma variedade de milho tolerante ao alagamento intermitente, possibilitando o cultivo nas regiões sujeitas ao alagamento. Esta variedade foi denominada Saracura BRS 4154 e, após nove ciclos de seleção, foi lançada comercialmente em 1997 e sua principal característica é a tolerância a períodos intermitentes de alagamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A variedade ‘Saracura BRS 4154’

A variedade Saracura BRS 4154 é resultado de um trabalho da Embrapa Milho e Sorgo em ciclos de seleção do milho em condições de alagamento intermitente, retirando-se as plantas com melhor desempenho e realizando cruzamentos entre estas. Após 9 anos de seleção, foi lançada comercialmente no ano de 1997 e, atualmente, ela se encontra no 18º ciclo de seleção, exibindo grandes resultados (Vitorino et al., 2001).

Esta variedade vem sendo estudada por diversos autores ao longo dos anos, desde a data de seu lançamento comercial. A taxa de sobrevivência desta variedade, em condições de alagamento, foi superior à de uma variedade sensível ao alagamento, a BR 107, durante até três dias de alagamento. Após quatro dias, quando as taxas do BR107 foram próximas de zero, a taxa da variedade saracura foi de 73% (Vitorino et al., 2001).

Em plantas de milho, o estresse por falta de oxigênio pode levar à formação de uma região translúcida no mesocótilo e, ainda, à formação de uma

constrição nesta região, as quais, geralmente, são características de plântulas altamente estressadas e que eventualmente morrem (Alves et al, 2002). Para a variedade ‘Saracura’, o tempo de exposição à anoxia necessário para que tais sintomas fossem observados foi bem maior, em comparação com a variedade BR107, mostrando que ela é, portanto, mais resistente ao estresse (Vitorino et al, 2001).

As plantas de milho Saracura foram capazes de aumentar a porcentagem de aerênquima encontrada nos tecidos da parte aérea e nas raízes, de forma crescente, em situações de hipoxia (Dantas et al., 2001). Este aumento demonstra uma adaptação anatômica que permite a retenção de gases ao longo de todo o tecido, favorecendo a sobrevivência dessas plantas expostas à hipoxia (Dew, 1997).

As plantas de milho Saracura podem sofrer redução na sua capacidade fotossintética ao serem submetidas à hipoxia intermitente. Esta redução, contudo, é pequena e não causa danos maiores às plantas, pois, após o período de hipoxia, elas foram capazes de recuperar a sua capacidade fotossintética. Além disso, sofreram apenas pequenas reduções na produção e acúmulo de matéria seca e de produção de folhas. Sendo assim, sem maiores danos, a variedade Saracura demonstrou ser tolerante a um período intermitente de alagamento, sofrendo apenas pequenas restrições em seu crescimento e desenvolvimento (Alves et al., 2002).

2.2 Catalase

A catalase ($H_2O_2:H_2O_2$ oxirredutase EC 1.11.1.6.) foi uma das primeiras enzimas a serem isoladas, no início do Século XX (1901). É uma proteína tetramétrica com um anel porfirínico com átomos de ferro. Ela catalisa a reação que converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e em oxigênio molecular (O_2) (Frugoli et al., 1996).

Existem várias isoenzimas de catalase e estas são codificadas por diferentes genes e cuja expressão pode ocorrer nas folhas, nas flores e nas raízes. Em *Arabidopsis thaliana* existem seis formas da enzima e as mais expressivas podem ser a Catalase 1, 2 e 3 codificadas pelos genes Cat1, Cat2 e Cat3, respectivamente. A Cat1 é a mais importante para as plantas e está presente nos peroxissomos e responsável por 80% da atividade desta enzima nas plantas, a Cat2 está localizada nos tecidos vasculares e a Cat3 no citosol (Frugoli et al., 1996; Scandalios, 1990).

O mecanismo de ação da catalase envolve, provavelmente, duas etapas. Na primeira, o H_2O_2 reage com o Fe do grupo heme da catalase, formando peróxido de ferro e a reação pode, então, tomar dois rumos: se existe alta concentração de H_2O_2 no substrato, o peróxido de ferro reage novamente com outra molécula de H_2O_2 , formando H_2O e O_2 . Se existir baixa concentração de H_2O_2 no substrato, o peróxido de ferro pode ser reduzido por doadores de H^+ , como o etanol e o ácido ascórbico.

Diversos trabalhos relatam que a atividade da catalase pode ser alterada por fatores ambientais, como: temperatura, radiação UV e contaminação do solo por metais pesados como o níquel (Pompeu, 2005).

2.3 Guaiacol peroxidase

A guaiacol peroxidase (GPX) EC 1.11.1.7 existe nas plantas na forma de duas isoenzimas, sendo uma forma aniônica (ácida) e outra catiônica (básica). A forma aniônica está envolvida com diversos processos na formação de parede celular, como a síntese de lignina e de suberina e a forma catiônica parece estar relacionada com a degradação de ácido indol acético (AIA) e a síntese de etileno (Fieldes & Gerhardt, 1998).

Vários tipos de estresse podem levar a alterações na atividade das isoenzimas da guaiacol peroxidase e essas alterações podem ser observadas também quanto ao desenvolvimento das plantas, pois sabe-se que a GPX tem sua atividade regulada pelo estágio de desenvolvimento (Fieldes & Gerhardt, 1998).

Alguns íons, como o cádmio (Cd) e o zinco (Zn), podem afetar a atividade das isoformas das guaiacol peroxidases. A aplicação de Cd aumentou a atividade de algumas isoformas da enzima e promoveu efeitos inibitórios em outras. Efeitos semelhantes foram observados quando o Zn foi aplicado (Fieldes & Gerhardt, 1998).

2.4 Ascorbato peroxidase

O substrato mais importante para a remoção do H_2O_2 da planta é o ácido ascórbico (Ascorbato) (Madhusudhan et al., 2003). A enzima ascorbato peroxidase EC 1.11.1.11 é responsável pela oxidação de duas moléculas de ascorbato para a redução de uma molécula de H_2O_2 em H_2O . O ascorbato é regenerado no ciclo da glutathiona-ascorbato pela oxidação da GSH e regeneração desta pela glutathiona redutase (GR). (Noctor & Foyer, 1998).

A ascorbato peroxidase (APX) é muito importante para o sistema antioxidante das plantas e algas. Ela pode ser encontrada em diferentes compartimentos celulares, como estroma e membrana tilacóide, cloroplasto e citosol. A atividade da enzima pode ser alterada sob diferentes estresses ambientais, como O_3 , luminosidade, estresse hídrico, patógenos e metais pesados (Willekens et al., 1995; Hernandez et al., 1994)

2.5 PEPcase

A fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilase (PEPcase) é uma enzima envolvida na fixação do CO₂ em uma reação de carboxilação no PEP, formando um ácido orgânico de 4 carbonos. A fixação do CO₂ é realizada na forma de HCO₂⁻ presente no citosol e incorpora mais este carbono ao PEP. E, por ação da malato desidrogenase, forma malato na presença de NADH.

2.6 Invertases e açúcares

As invertases são uma classe de isoenzimas presentes em diferentes compartimentos celulares e atuam ativamente no metabolismo do carbono das células. As três isoformas são: a invertase ácida de parede (IAP), a invertase ácida vacuolar (IAC) e a invertase neutra do citosol (INC). A IAP é uma enzima altamente atuante na clivagem da sacarose, que está presente no apoplasto, gerando glicose e frutose que passam, então, para o interior celular. São muito importantes no descarregamento do floema e no fornecimento de hexoses como substrato para o metabolismo energético de órgãos dreno. A IAC está presente nos vacúolos e atua em pH mais ácido em relação à enzima citosólica. A INC é uma enzima que atua na clivagem da sacarose que penetra no citosol gerando hexoses.

O estudo das invertases sob diferentes situações ambientais é apresentado em vários trabalhos, exibindo alterações quanto à luminosidade, ao efeito de cálcio e a outros fatores. Tais estudos podem elucidar o metabolismo do carbono (Ferrer et al., 2005; Zheng et al., 1999).

Os açúcares redutores são, principalmente, a glicose e a frutose, com uma hidroxila livre no carbono 1, as quais se oxidam, promovendo a redução de outros compostos. São, portanto, carboidratos reativos. Para o metabolismo das plantas são importantes por entrarem em todo o metabolismo primário, na glicólise, na via das pentoses fosfato e em diversas outras reações metabólicas. Fatores ambientais podem influenciar os teores de açúcares redutores e essas alterações ilustram um comportamento adaptativo dessas plantas (Taiz & Zeiger, 2004; Heldt, 2005; Ferrer et al., 2005).

Os açúcares solúveis totais incluem os açúcares redutores, além da sacarose e outros menos representativos, por existirem em menor quantidade. É um fator que pode ser alterado de acordo com o ambiente em que a planta está crescendo. Seu estudo pode ser utilizado para estimar os valores da sacarose e como os carboidratos importantes para o metabolismo estão se comportando fisiologicamente (Taiz & Zeiger, 2004; Heldt, 2005; Ferrer et al., 2005).

2.7 Anatomia

A anatomia das plantas sob alagamento pode ser influenciada de diferentes formas, como as modificações na espessura dos tecidos. A principal resposta ao alagamento em raízes é a formação de aerênquima, sendo um sistema que facilita a difusão de O_2 e CO_2 ao longo dos tecidos vegetais. O aerênquima pode ser constitutivo quando está presente na espécie naturalmente ou pode, ainda, ser induzido de acordo com as condições ambientais (principalmente seca e alagamento). A formação de aerênquima pode dar-se de forma esquizógena (afastamento de células) ou lisígena (apoptose). A apoptose celular está relacionada ao estímulo pelo etileno, que tem como precursor o ACC e tem a sua produção estimulada pelo alagamento (Dew, 1997; Bouranis et al., 2006).

2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; GOULART, P. F. P.; DANTAS, B. F.; GOUVÊA, J. A.; PURCINO, R. P.; MAGALHÃES, P. C.; FRIES, D. D.; LIVRAMENTO, D. E.; MEYER, L. E.; SEIFFERT, M.; SILVEIRA, T. Mecanismos de tolerância da variedade de milho “Saracura” (BRS 4154) ao encharcamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 1, p. 33-40, jan./abr. 2002.

BOURANIS, D. L.; CHORIANOPOULOU, S. N.; KOLLIAS C.; MANIOU, P.; PROTONOTARIOS V. E.; SIYIANNIS, V. F.; HAWKESFORD, M. J.; Dynamics of Aerenchyma Distribution in the Cortex of Sulfate-deprived Adventitious Roots of Maize, **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, n. 5, p. 695–704, May. 2006.

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

DEW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 223-250, June 1997.

FERRER, J. L. R.; MAGALHÃES, P. C.; ALVES, J. D.; VASCONCELOS, C. A.; DELÚ FILHO, N.; FRIES, D. D.; MAGALHÃES, M. M.; PURCINO, A. A. C. Calcium relieves the deleterious effects of hypoxia on a maize cultivar selected for waterlogging tolerance. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, n. 3, p. 381-389, Jan./Abr. 2005.

FIELDES, M. A.; GERHARDT, K. E.; Flax guaiacol peroxidases can be used to illustrate the possibility of misinterpreting the effects of stress on the activity of developmentally regulated enzymes, **Plant Science**, Clare, v. 132, n. 1, p. 89–99, Feb. 1998.

FRUGOLI, J. A.; ZHONG, H. H.; NUCCIO M. L.; Mc COURT, P. Mc PEEK, M. A.; THOMAS, T. L.; Mc CLUNG, C. L. Catalase 1s Encoded by a Multigene Family in *Arabidops thaliana* (1.) Heynh, **Plant Physiology**, Bethesda, v. 11, n. 2, p. 327-336, May 1996.

HELDT, H. W. **Plant Biochemistry**. 3. ed. Burlington: Elsevier, 2005. 657p.

MADHUSUDHAN, R.; ISHIKAWA, T.; SAWA, Y.; SHIGEOKA S.; SHIBATA, H. Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells, **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 117, n. 4, p. 550–557. Apr. 2003

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, **annual review of plant physiology and molecular biology**, Rockville, v. 49, n. 1, p. 249-289, June 1998.

POMPEU, G. B. **Análise da resposta antioxidativa de células in vitro de fumo (Nicotiana tabacum cv – BY 2) submetidas ao metal pesado níquel**, 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado – Ecologia de Agroecossistemas)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

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

SCANDALIOS, J.G. Response of Plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 28, n.1, p. 1-41, Apr. 1990.

VITORINO, P. G.; ALVES, J. D.; MAGALHÃES, P. C.; MAGALHÃES, M. M.; LIMA, L. C. O.; OLIVEIRA, L. E. M. Flooding tolerance and cell wall alterations in maize mesocotyl during hypoxia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 8, p. 1027-1035, ago. 2001.

WILLEKENS, H.; INZE, D.; VANMONTAGU, M.; VANCAMP, W. Catalases in plants. **Molecular breeding**, San Diego, v. 1, n. 3, p. 207-228, Sept. 1995

3 CAPÍTULO 1:

Ciclos de seleção podem melhorar a formação de aerênquimas e outros atributos radiculares do milho ‘Saracura BRS 4154’ para a tolerância ao alagamento

(preparado segundo as normas da revista Acta Botânica Brasilica)

Fabricio José Pereira^{3,4}, Evaristo Mauro de Castro¹, Paulo César Magalhães⁵,
Thiago Corrêa de Souza¹

³ Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Campus Universitário, Lavras-MG, caixa postal 37, CEP 37200-000.

⁴ Autor para correspondência: fjprock@hotmail.com

⁵ Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, Caixa postal -151, CEP 37701-970.

3.1 Resumo

O alagamento é um problema encontrado em diversas áreas com potencial agrícola, afetando, principalmente, os produtores mais pobres. O milho Saracura BRS 4154 foi desenvolvido no intuito de possibilitar o seu plantio em regiões sujeitas ao alagamento, estando, atualmente, no 18º ciclo de seleção. O presente trabalho foi realizado com os objetivos de verificar as modificações nas características anatômicas radiculares relacionadas com o alagamento e o seu incremento ou não ao longo dos 18 ciclos de seleção em comparação com duas variedades controle (BR 107 e BRS 1010) submetidas ao alagamento intermitente por 2 dias. As amostras radiculares foram preparadas pelas microtécnicas apropriadas e analisadas em microscopia óptica. Foram observados, em relação ao grupo controle e aos ciclos anteriores, aumentos na capacidade de formação de aerênquima, diminuição no córtex, diminuição no diâmetro dos vasos, diminuição da camada subepidérmica, aumento na espessura do floema e epiderme. Dessa forma, os sucessivos ciclos de seleção foram capazes de melhorar as características do milho ‘Saracura’ e a sua adaptabilidade a ambientes alagados.

Palavras Chave: Milho saracura, hipoxia, anatomia, alagamento, aerênquima.

3.2 Abstract – Successive selection cycles can increase the aerenchyma formation and other root attributes of the “saracura” maize BRS 4154 to the flood resistance.

Flooding is a stress to areas with potential to the agriculture, particularly affecting the world's poorest farmers. The saracura maize (BRS-4154) was developed to make possible its cultivation under flooding conditions, currently it's at the 18th selection cycle. This work aimed to verify the root anatomical characteristics related to the flooding stress and its increase or not along the 18 selection cycles and two control varieties (BR 107 and BRS 1010) under two days intermittent flooding. The root samples were prepared by the usual plant microtechniques and analyzed under light microscopy. Compared to the control group and the previous cycles were found: increase in the aerenchyma formation, decrease in the cortex, decrease in the diameter of xylem vessels, decrease in the above epidermis layers, increase in the phloem and epidermis. So, the successive selection cycles could cause improvements to the saracura maize and in its adaptability to the flooding stress.

Key words – saracura maize, hipoxy, anatomy, flooding, aerenchyma.

3.3 Introdução

O alagamento é um fator ambiental relativamente comum nas áreas cultivadas do planeta, que gera dificuldades para a produção agrícola e florestal (Andrade et al., 1999). A América do Sul possui vários ambientes sujeitos ao alagamento, como as Florestas de Galeria, o Pantanal e os chamados solos de várzea (Andrade et al., 1999), resultantes de um alagamento periódico na época das chuvas ou em cheias de rios. No Brasil, aproximadamente 28 milhões de hectares de terras que sofrem alagamento possuem potencial como terras agricultáveis (Vitorino et al., 2001).

A condição de alagamento pode ser provocada por fatores naturais, como a elevação dos níveis dos rios, a ação de tempestades, as cheias periódicas, uma drenagem inadequada do solo ou, ainda, por fatores antrópicos, como o excesso de irrigação (Kozłowski, 1997). Isso pode levar à condição de anoxia ou de hipoxia, dependendo do teor de oxigênio do solo onde a planta está crescendo. Ocorre, ainda, a expressão de proteínas específicas de estresse aneróbio, os chamados polipeptídeos aneróbios (ANPs) (Liao & Lin, 2001).

No alagamento ocorrem grandes alterações quanto à disponibilidade de oxigênio no solo, condição esta que é essencial para a manutenção do metabolismo aeróbio e, assim, a produção de energia suficiente para que a planta cresça adequadamente (Kozłowski, 1984). Esta redução no crescimento da planta está relacionada à diminuição da produção de ATP, resultante do metabolismo anaeróbio, fechamento estomático, menor fotossíntese, absorção de nutrientes e translocação de carboidratos (Kozłowski, 1984).

As plantas se adaptam às mudanças provocadas pelo alagamento mudando seu metabolismo e sua estrutura anatômica para que possam sobreviver às exigências do novo ambiente. Assim, passam a produzir ATP pelo

metabolismo anaeróbio que, mesmo em pequenas quantidades, ajuda na manutenção dos meristemas e forma um tecido especializado em armazenamento de oxigênio, promovido pela apoptose celular estimulada por etileno, denominado aerênquima (Dew, 1997). O aerênquima pode ser induzido por outros fatores ambientais, como a deficiência nutricional. Isso ocorre quando ocorre deficiência de enxofre ao longo de 77% da extensão da raiz, podendo levar à formação de raízes adventícias (Bouranis et al., 2006). A nutrição mineral também pode inibir a formação de aerênquimas, como ocorre com a adição de cálcio, que participa da formação da parede celular e, assim, reduziu a formação de aerênquimas em milho ‘Saracura’ (Ferrer et al., 2004).

O milho é classificado como uma planta sensível ao estresse por anoxia e, dessa forma, a produção dessa planta em ambientes sujeitos ao alagamento se tornaria inviável. A variedade saracura (BRS-4154) foi desenvolvida pela Embrapa Milho e Sorgo para resistir a períodos de alagamento e, assim, tornar possível a sua produção nas diversas regiões onde ocorre este tipo de estresse (Alves et al., 2002). Essa variedade apresentou melhoramentos quanto à produção e à sobrevivência e capacidade para o desenvolvimento de aerênquima nas raízes e na parte aérea da planta (Alves et al., 2002).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito que os sucessivos ciclos de seleção promoveram nas estruturas anatômicas radiculares do milho ‘Saracura BRS 4154’ relacionadas com a tolerância ao alagamento.

3.4 Material e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação nas áreas experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. O milho Saracura está, atualmente, no seu 18º ciclo anual de seleção, em que é submetido ao alagamento intermitente e as plantas com melhores resultados são

selecionadas. Neste experimento, foram codificados como C1 a C18, em que a letra C representa o ciclo e o número, o ciclo que a sigla representa.

Foi utilizado solo de várzea, adubado, colocado em vasos com capacidade de 20 kg. Os ciclos escolhidos foram C1, C3, C5, C7, C9, C11, C13, C15, C17 e C18, além dos genótipos BR 107, sensíveis ao alagamento e o híbrido BRS 1010 como testemunha. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, perfazendo um total 48 de vasos. Foram semeadas seis sementes por vaso no plantio, desbastando mais tarde para duas plantas.

O início do encharcamento no solo dos vasos foi no estágio de seis folhas completamente desenvolvidas, quando o ponto de crescimento das plantas se encontrava acima do nível da superfície do solo. A adubação em cobertura foi realizada na dosagem de 100 kg ha⁻¹ de N; divididos em 10 aplicações semanais de 10 kg ha⁻¹ de N (Magalhães et al., 2001). As plantas foram submetidas ao alagamento em intervalos intermitentes de 2 dias, quando os vasos eram completamente encharcados e deixados sem nova adição de água até a próxima aplicação. A coleta das amostras para anatomia ocorreu em um período de 2 meses em relação à primeira aplicação do alagamento.

Foi utilizada uma planta de cada vaso para a coleta de amostra de 5 raízes completas (contendo as regiões: apical, de alongamento, pelifera e basal) por repetição, as quais foram fixadas em FAA 70 (Johansen, 1940), por 48 horas e, posteriormente, preservadas em etanol 70%, até a data das análises. As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. As raízes foram cortadas na região de 4±0,5 cm a partir do ápice radicular (Melo et al., 2007). Esses fragmentos foram utilizados para a realização dos cortes transversais em micrótomo de mesa. Os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio 5%, por 10 minutos (Kraus & Arduin, 1997) reidratados por 10 minutos, corados

com astrablau (solução de safranina e azul de astra) e montados em lâminas com glicerina 50%.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico acoplado com câmera digital, com a qual foram realizadas fotografias dos cortes. As fotografias foram utilizadas para as medições dos parâmetros anatômicos em um programa de análise de imagem Imagetool – freeware calibrado com uma régua microscópica fotografada nos mesmos aumentos das fotografias. Os parâmetros anatômicos mensurados foram: área de aerênquima encontrada no córtex; proporção de aerênquima encontrado no córtex; proporção da área do cilindro vascular em relação à área total da raiz; proporção da área do córtex em relação à área total da raiz; espessura do córtex; espessura da camada de células suberizadas presentes na região da hipoderme; circunferência total da raiz; circunferência do cilindro vascular; proporção entre a circunferência do cilindro vascular e a circunferência total; diâmetro das células corticais; espessura da epiderme; espessura da endoderme; espessura do córtex; diâmetro das células do metaxilema; diâmetro das células do parênquima do cilindro vascular e espessura do floema no cilindro vascular.

Foram realizadas 4 medições de cada característica anatômica em cada repetição e utilizada a média para definir o valor da característica para cada planta. A proporção de aerênquima foi calculada com base na divisão da área total de aerênquima formado pela área total do córtex.

Os dados foram testados, quanto à normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk e, quanto à homocedacidade, pelo teste de Lavene, todos com distribuição normal e variâncias homogêneas. Foi realizada análise de variância com o teste de F para detectar as diferenças entre os tratamentos e o teste de Skott-Knott, a 5%, para a separação das diferentes médias.

3.5 Resultados e discussão

Pôde-se observar um aumento significativo na área total de aerênquima ao longo dos ciclos de seleção. A área total de aerênquima do primeiro ciclo (C1) representa apenas 10,8 % da área do último ciclo de seleção, como se pode observar nos dados da Tabela 1. Em comparação com a testemunha BR 107, o incremento na área de aerênquima é ainda mais acentuado; a área de aerênquima dessa variedade representa apenas 2% da encontrada em C18. A BRS 1010 apresenta valores mais altos que a outra testemunha, ficando entre os valores intermediários dos ciclos, mas, ainda assim, menores que o último ciclo de seleção (Tabela 1 e Figura 1).

A proporção de aerênquima formado em relação à área total do córtex teve um aumento ao longo dos vários ciclos seletivos (Tabela 1). O aumento em relação à testemunha BR 107 já pôde ser observado a partir do ciclo C5, possuindo valores iguais aos da BRS 1010. A partir do ciclo C13, pode-se observar o aumento das médias em relação às duas testemunhas e aos ciclos iniciais (Tabela 1).

A formação de aerênquima em raízes de milho ocorre em resposta ao estresse por hipoxia. Essa formação é do tipo lisígena e começa ocorrendo na região central do córtex e, posteriormente, se espalha para o restante do córtex de forma radial e tangencial. O desenvolvimento do aerênquima leva, então, à formação de espaços intercelulares conectados ao longo do eixo da raiz que facilitam a difusão dos gases (Gunawardena, 2008) e, conseqüentemente, permitem uma melhor distribuição do O₂ nos tecidos e, assim, possibilitam o metabolismo aeróbio, não restringindo a produção de ATP de maneira tão severa. A apoptose (morte celular programada) ocorre no início do desenvolvimento da célula, quando ela ainda está com menos de 12 horas de vida e em uma região com mais de 10 mm de distância da ponta da raiz

(Gunawardena, 2008). A manutenção dos níveis de ATP permite que o meristema apical continue ativo (Liao & Lin, 2001) e, com isso, o crescimento da raiz não fica tão limitado.

As proporções da área do córtex e do cilindro vascular não foram diferentes nos ciclos ou no grupo controle (Tabela 1). A área do córtex e a do cilindro vascular podem ter influência na difusão de água e de gases e parece não ter influenciado diretamente os mecanismos de tolerância da variedade ‘Saracura’, ao longo dos ciclos

Tabela 1. Valores observados nos tecidos radiculares relacionados à formação de aerênquima e com a condutividade hidráulica.

Ciclos	AAE (mm ²)	PA (%)	PCV (%)	PC (%)	EC (µm)	CS (µm)
C1	0,21 d	08,22 c	0,32 a	0,68 a	615,04 a	060,56 b
C3	0,23 d	10,69 c	0,25 a	0,76 a	715,08 a	149,96 a
C5	0,52 c	35,37 b	0,18 a	0,82 a	556,97 b	093,23 b
C7	0,80 b	33,16 b	0,29 a	0,71 a	482,09 b	071,41 b
C9	1,02 b	34,59 b	0,26 a	0,74 a	673,68 a	117,41 a
C11	1,05 b	34,11 b	0,30 a	0,70 a	531,98 b	091,91 b
C13	0,69 c	41,91 a	0,24 a	0,75 a	601,72 b	099,46 b
C15	0,44 c	42,17 a	0,30 a	0,70 a	446,39 b	100,00 a
C17	0,92 b	47,53 a	0,27 a	0,73 a	483,67 b	081,26 b
C18	1,95 a	46,59 a	0,24 a	0,76 a	476,90 b	068,81 b
BR 107	0,04 d	01,71 c	0,30 a	0,70 a	657,21 a	134,53 a
BRS 1010	0,90 b	35,31 b	0,30 a	0,70 a	465,10 b	088,57 b

AAE= área de aerênquima encontrada no córtex; PA = proporção de aerênquima encontrado no córtex; PCV = proporção do cilindro vascular em relação à área total da raiz; PC = proporção do córtex em relação à área total da raiz; EC = espessura do córtex; CS = espessura da camada de células suberizadas presentes na região da hipoderme. As médias das colunas, seguidas de letras distintas, são diferentes, pelo teste de Skott-Knott, a 5%.

Contudo, a espessura do córtex foi reduzida ao longo dos ciclos de seleção (Tabela 1 e Figura 1), reduzindo em 22,6% a sua espessura no ciclo C18 em relação ao C1 e em 27,5% em relação à variedade BR107. A formação de aerênquimas pode reduzir de forma significativa a condutividade hidráulica da

raiz (Fan et al., 2007), que é essencial para a manutenção do fluxo transpiratório e a distribuição de nutrientes ao longo da planta pelo fluxo do xilema. Pode-se relacionar a redução na espessura do córtex com a diminuição da distância necessária para a água chegar ao cilindro vascular, melhorando a condutividade hidráulica.

Esta explicação pode ser também aplicada à diminuição observada na camada suberizada abaixo da epiderme da raiz (Tabela 1 e Figura 1) como componente do córtex que teve uma redução de 54,22% em relação aos ciclos iniciais (C3) e de 48,74% em relação à variedade BR107, em comparação com os valores do último ciclo (C18). A camada lignificada é uma forte barreira apoplástica e a sua redução diminui a resistência ao fluxo de água para o cilindro vascular, conservando, assim, a condutividade hidráulica da raiz.

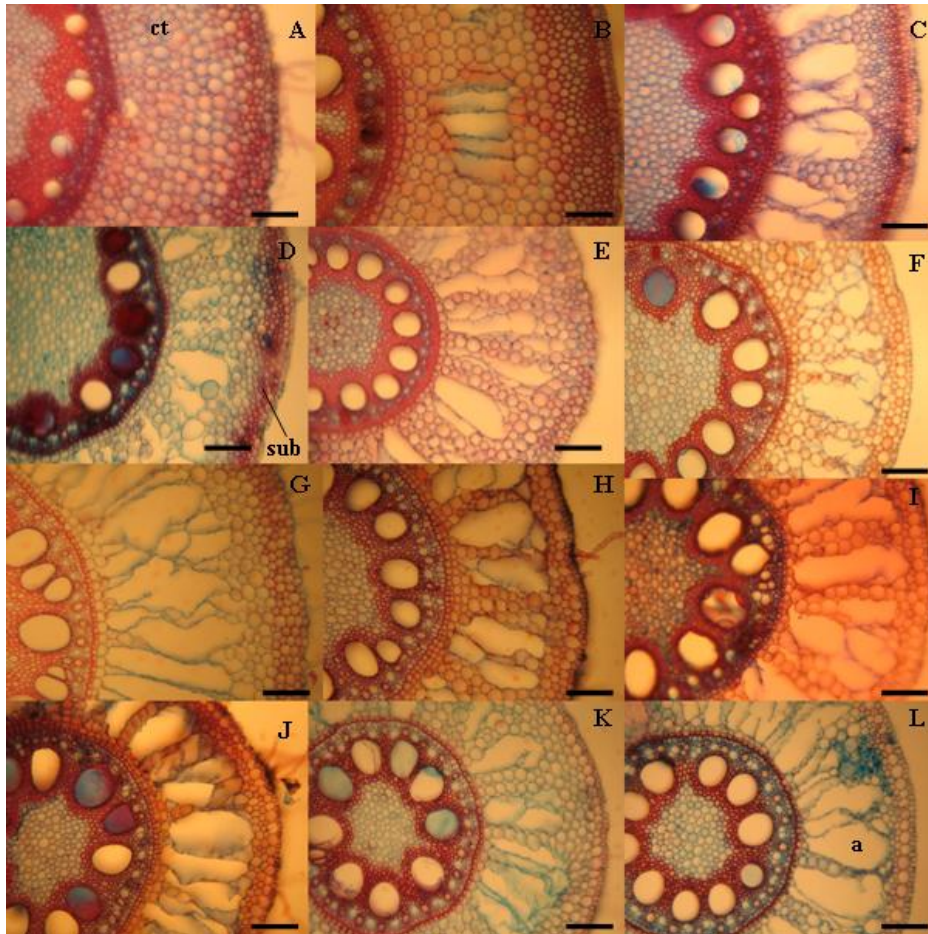


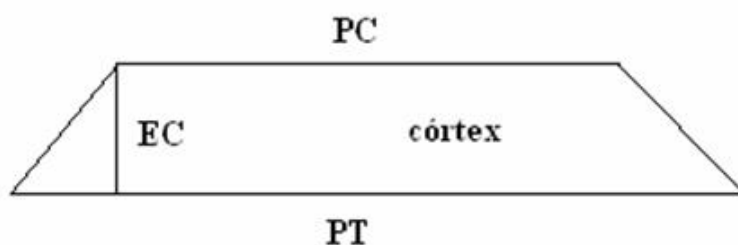
Figura 1. Seções transversais de raízes dos ciclos de seleção do milho saracura e das testemunhas, ilustrando a progressão na formação de aerênquima, redução nos tecidos corticais e na camada com espessamento na região subepidérmica. ct = córtex, a = aerênquima, sub = camadas subepidérmicas com lignificação. A= BR107, B= C1, C= C3, D= C5, E= BRS1010, F= C7, G= C9, H= C11, I= C13, J= C15, K= C17, L= C18. A barra corresponde a 200 μm .

A relação entre a proporção de área do córtex, que não se alterou e a espessura deste tecido, que foi reduzida ao longo dos tratamentos, pode ser definida como um investimento das plantas para manter a área disponível para a formação de aerênquima e, ainda, manter a condutividade hidráulica com a redução da espessura do córtex. Pode-se observar que a espessura do córtex

influencia a área total deste tecido, contudo, este não é o único parâmetro que influencia na área. Se isso acontecesse, com a redução da espessura do córtex, haveria também redução na proporção desta área em relação à área total. Assim, um modelo, como o da Figura 1, explica como pode ocorrer uma diminuição da espessura e, ainda assim, a planta manter uma área igual.

A geometria do córtex (se observado aberto como uma faixa) é a de um trapézio, com a base menor formada pelo perímetro do cilindro vascular e a base maior formada pelo perímetro total da raiz, delimitado pela epiderme. A altura do trapézio é composta pela distância entre as duas bases perpendiculares e esta é a medida da espessura do córtex. Pela fórmula utilizada para o cálculo da área do trapézio (Figura 2), observa-se que, para manter uma área do córtex quando ocorre a diminuição da espessura do mesmo, devem-se aumentar os valores do perímetro do cilindro vascular ou do perímetro total da raiz ou, mesmo, aumentar os dois parâmetros proporcionalmente e, assim, compensando a diminuição na espessura do córtex. Tais fatos podem ser observados na Tabela 2.

Isso mostra que a proporção entre os perímetros (as bases do trapézio) se mantém como é indicado na Tabela 2 e, assim, os aumentos ocorrem em ambos os perímetros quando são necessários para preservar a área do córtex. Este fenômeno ocorreu neste trabalho e aqui fica registrada uma tentativa de explicá-lo, lembrando que essas alterações mantiveram a área disponível para a formação de aerênquima e, ainda, a condutividade hidráulica, contribuindo de forma excepcional para a adaptação dessas plantas ao ambiente alagado.



$$\text{Área do córtex} = \frac{EC (PC + PT)}{2}$$

Figura 2. Modelo para representar a área do córtex e facilitar o entendimento do comportamento das variáveis de área e espessura do córtex. EC= espessura do córtex (altura do trapézio), PC= perímetro do cilindro vascular (base menor do trapézio), PT= perímetro total da raiz (base maior do trapézio).

Tabela 2. Valores observados para o perímetro total da raiz, do cilindro vascular e a proporção entre os mesmos.

Ciclos	CT	CC	PP
C1	1,10 a	0,62 a	0,56 a
C3	1,13 a	0,57 a	0,45 a
C5	0,77 b	0,33 b	0,43 a
C7	1,05 a	0,57 a	0,54 a
C9	1,13 a	0,59 a	0,51 a
C11	1,18 a	0,64 a	0,55 a
C13	0,80 b	0,40 b	0,49 a
C15	0,68 b	0,37 b	0,54 a
C17	0,91 b	0,47 b	0,52 a
C18	1,32 a	0,65 a	0,49 a
BR 107	0,99 a	0,56 a	0,53 a
BRS 1010	1,07 a	0,58 a	0,54 a

CT= circunferência total da raiz, CC= circunferência do cilindro vascular, PP.= proporção entre a circunferência do cilindro vascular e a circunferência total. As médias das colunas seguidas de letras distintas são diferentes pelo teste de Skott-Knott a 5%.

As células do córtex exibiram um aumento no diâmetro nos ciclos de seleção do milho ‘Saracura’, em comparação com as testemunhas (Tabela 3 e Figura 3). Os valores do C18 correspondem a um aumento de 21,98%, em relação ao BR107 e BRS 1010. O aumento no tamanho das células corticais pode estar relacionado com a diminuição do número de camadas celulares do córtex e com a formação de maiores espaços intercelulares, que auxiliam na manutenção de um sistema de difusão de gases contínuo com o aerênquima formado. Células maiores geram espaços intercelulares maiores por não conseguirem um contato entre toda a extensão de sua parede celular.

A espessura da epiderme aumentou em 23,54% no ciclo C18 em relação à variedade BR107 e em 30,49% em relação à variedade BRS1010 (Tabela 2 e Figura 2). Este aumento na epiderme forma dois grupos estatisticamente distintos e a variedade Saracura foi superior na maioria dos seus ciclos de seleção, em comparação aos controles. Esta é uma característica favorável para a variedade Saracura e pode contribuir para a sua taxa de sobrevivência e a manutenção do sistema radicular. Isso porque forma uma barreira (Esaú, 1974) contra a entrada de microrganismos patogênicos, evitando infecções e lesões nos tecidos causadas por tais agentes e uma barreira ainda para a entrada de substâncias tóxicas presentes em solo alagado. Sendo o ambiente alagado propício para a propagação de bactérias anaeróbias e de substâncias tóxicas (Kozłowski, 1997), a sobrevivência neste ambiente pode se relacionar ao impedimento da penetração desses agentes na raiz.

A endoderme foi aumentada em 26,7% nas maiores médias, que abrangem os ciclos de seleção do milho Saracura e o híbrido BRS 1010 (Tabela 3 e Figura 3), quando comparados à variedade BR107. O ganho em espessura da endoderme está relacionado à formação de uma barreira apoplástica contra a

entrada de patógenos ou ao refluxo de água ou gases, ajudando na manutenção da condutividade hidráulica radicular.

Foi observada diminuição do diâmetro dos vasos do metaxilema ao longo dos ciclos de seleção do milho Saracura, se aproximando dos valores medidos nas testemunhas. No ciclo C18, essa diminuição foi de 37,4%, em comparação com os ciclos iniciais (C1). Este é um fator que beneficia a planta, pois vasos de xilema com diâmetro menor fazem com que a coluna de água conduzida encoste nas paredes do elementos de vaso, não deixando espaços propícios para a formação de bolhas de ar que causam cavitação (Hacke & Sperry, 2001). Assim, a diminuição do diâmetro dos vasos foi uma importante característica ganha durante a seleção do milho Saracura, mantendo a condutividade hidráulica da planta.

Tabela 3. Características quantitativas das células de tecidos radiculares dos ciclos de seleção do milho saracura e variedades utilizadas como controle.

Ciclos	CC (μm)	EP (μm)	EM (μm)	DX (μm)	CCV (μm)	FL (μm)
C1	54,20 b	34,07 a	30,27 a	149,96 a	46,59 a	71,87 a
C3	68,20 a	34,79 a	25,45 a	131,69 b	33,61 b	76,69 a
C5	42,42 c	30,49 b	21,49 b	100,41 c	37,52 a	55,35 b
C7	51,56 b	27,69 b	21,63 b	111,18 c	37,57 a	62,10 b
C9	51,34 b	30,12 b	21,95 b	105,88 c	38,68 a	54,36 b
C11	50,66 b	33,27 a	28,22 a	102,02 c	36,08 a	56,39 a
C13	54,90 b	34,02 a	22,34 b	098,47 c	36,69 a	72,87 a
C15	53,68 b	31,82 a	21,41 b	096,93 c	36,99 a	64,19 a
C17	52,79 b	31,44 a	26,09 a	100,97 c	34,47 b	65,84 a
C18	54,62 b	34,82 a	24,64 a	096,04 c	39,09 a	77,62 a
BR 107	44,78 c	28,25 b	22,36 b	093,50 c	32,84 b	48,32 b
BRS 1010	44,90 c	26,68 b	25,80 a	104,70 c	35,13 b	47,58 b

CC= Diâmetro das células corticais; EP= Espessura da epiderme; EN= Espessura da endoderme; DX= Diâmetro das células do xilema; CCV= Diâmetro das células do parênquima do cilindro vascular; FL= Espessura do floema no cilindro vascular. As medias das colunas seguidas de letras distintas são diferentes pelo teste de Skott-Knott a 5%.

As células do parênquima do cilindro vascular exibiram um aumento em seu diâmetro no último ciclo e na maioria dos outros ciclos em relação às testemunhas. Contudo, os ciclos C3 e C17 apresentaram valores semelhantes aos das testemunhas (Tabela 3). O aumento no tamanho dessas células pode ser relacionado ao aumento do diâmetro do cilindro vascular. O aumento do diâmetro do cilindro vascular e a diminuição do diâmetro do córtex observada (Tabela 1 e Figura 2) podem ser relacionados a um ganho na condutividade hidráulica nas raízes do milho Saracura.

A espessura do floema foi aumentada em 60,63%, no ciclo C18, junto com as maiores médias em relação aos grupos controle (Tabela 3 e Figura 3). Este aumento significativo contribui para a adaptação da planta, por auxiliar no fluxo de fotossintatos da parte aérea para as raízes, promovendo os corretos crescimento e sobrevivência do sistema radicular. A produção de ATP é reduzida com a diminuição da quantidade de O₂ disponível, pois a rota metabólica é desviada para a anaerobiose (Kozlowski, 1984). A planta necessita, então, de uma maior quantidade de carboidratos para a utilização na glicólise e a conseqüente produção de ATP, pois estes carboidratos são subaproveitados. Dessa forma, um aumento de espessura do floema e, possivelmente, do fluxo de carboidratos neste tecido fornece mais substrato respiratório para as plantas que podem, então, exibir maior tolerância ao alagamento.

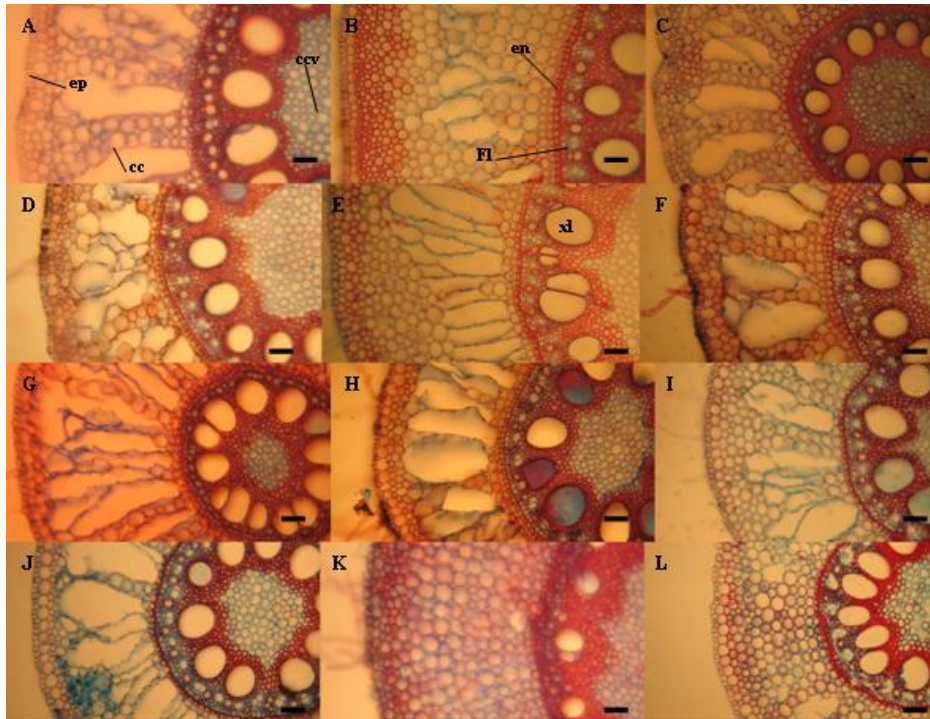


Figura 3. Detalhes de seções transversais das raízes de diferentes ciclos de seleção do milho saracura e das testemunhas, identificando as células mensuradas. ep= epiderme, cc= célula do córtex, ccv= célula do cilindro vascular, em= endoderme, Fl= floema. A= C1, B= C3, C= C5, D= C7, E= C9, F= C11, G= C13, H= C15, I= C17, J= C18, K= BR107, L=BRS 1010. A barra indica 100µm.

3.6 Conclusões

Os sucessivos ciclos de seleção do milho Saracura foram capazes de otimizar as características anatômicas essenciais ao bom desempenho das plantas tolerantes ao estresse por alagamento intermitente. Também aumentaram a sua capacidade de produzir aerênquima, suas barreiras apoplásticas e as características que ajudam na manutenção da condutividade hidráulica das plantas. Portanto, a seleção em ciclos progressivos foi eficiente e houve claro ganho em adaptabilidade dos últimos ciclos em relação aos primeiros.

3.7 Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado (F. J. Pereira). À Embrapa Milho e Sorgo, pelo financiamento do projeto.

3.8 Referências Bibliográficas

ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; GOULART, P. F. P.; DANTAS, B. F.; GOUVÊA, J. A.; PURCINO, R. P.; MAGALHÃES, P. C.; FRIES, D. D.; LIVRAMENTO, D. E.; MEYER, L. E.; SEIFFERT, M.; SILVEIRA, T. Mecanismos de tolerância da variedade de milho “Saracura” (BRS 4154) ao encharcamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 1, p. 33-40, Jan. 2002.

ANDRADE, A. C. S.; RAMOS, F. N.; SOUZA, A. F.; LOUREIRO, M. B.; BASTOS, R. Flooding effects in seedlings of *Cytherexylum myrianthum* Cham. and *Genipa americana* L.: responses of two neotropical lowland tree species. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 281-285. Aug. 1999.

BOURANIS, D. L.; CHORIANOPOULOU, S. N.; KOLLIAS C.; MANIOU, P.; PROTONOTARIOS V. E.; SIYIANNIS, V. F.; HAWKESFORD, M. J.; Dynamics of Aerenchyma Distribution in the Cortex of Sulfate-deprived

Adventitious Roots of Maize. **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, n. 5, p. 695–704, May 2006.

DEW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 223-250, June 1997.

ESAÚ, K. **Anatomia das Plantas com Sementes**. São Paulo: Edgard Blucher, 1974. 293 p.

FAN, M.; BAI, R.; ZHAO, X.; ZHANG, J. Aerenchyma Formed Under Phosphorus Deficiency Contributes to the Reduced Root Hydraulic Conductivity in Maize Roots. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 49, n. 5, p. 598-604, May 2007.

FERRER, J. L. R.; MAGALHÃES, P. C.; ALVES, J. D.; VASCONCELOS, C. A.; DELÚ FILHO, N.; FRIES, D. D.; MAGALHÃES, M. M.; PURCINO, A. A. C. Calcium relieves the deleterious effects of hypoxia on a maize cultivar selected for waterlogging tolerance. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, n. 3, p. 381-389, set./dez. 2005.

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

HACKE, U. G.; SPERRY, J. S. Functional and Ecological Xylem Anatomy. **perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Zurich, v. 4, n. 2, p. 97-115, Jan. 2001.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 300 p.

KOZLOWSKI, T. T. Plant Responses to Flooding of Soil. **BioScience**, Washington, v. 34, n. 3, p. 162-167, Jan. 1984.

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

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. 221p.

LIAO, C. T.; LIN C. H. Physiological Adaptation of Crop Plants to Flooding Stress. **Proceedings of National Science Council**, Beijing, v. 25, n. 3, p. 148-157, Apr. 2001.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; ANDRADE, C. de L. T. de; OLIVEIRA, A. C. de; SOUZA, I. R. P. de; GAMA E. E. G. Adaptação do milho a diferentes condições de alagamento. In: CONGRESSO NACIONAL DE FISILOGIA VEGETAL, n. 8., 2001, Ilhéus. **Anais...** Ilhéus: CNFV, 2001. 1 CD-ROM.

MELO, H. C.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.; MELO, L. A.; ALVES, J. D. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 145-153, jun. 2007.

VITORINO, P. G.; ALVES, J. D.; MAGALHÃES, P. C.; MAGALHÃES, M. M.; LIMA, L. C. O.; OLIVEIRA, L. E. M. Flooding tolerance and cell wall alterations in maize mesocotyl during hypoxia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 8, p. 1027-1035, ago. 2001.

4 CAPÍTULO 2:

Otimização da estrutura e função das folhas de milho Saracura BRS-4154 oriundas de sucessivos ciclos de seleção submetidos ao alagamento do solo.

(preparado segundo as normas da revista Acta Botânica Brasilica)

Fabricio José Pereira⁶⁷, Evaristo Mauro de Castro¹, Paulo César Magalhães⁸,
Thiago Corrêa de Souza¹

⁶ Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Campus Universitário, Lavras-MG, caixa postal 37, CEP 37200-000.

⁷ Autor para correspondência: fjprock@hotmail.com

⁸ Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, Caixa postal -151, CEP 37701-970.

4.1 Resumo

O alagamento é um problema que afeta uma grande área correspondente a terras agricultáveis, causando prejuízos a pequeno e grandes produtores e restrições na produção. Sendo o milho uma planta pouco tolerante a este tipo de estresse, a variedade Saracura surgiu como uma alternativa para a produção nesses ambientes. Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar as melhorias na estrutura foliar, aliadas à função que exercem ao longo de amostras dos 18 ciclos de seleção desta variedade submetidas ao alagamento intermitente, por dois dias, em contraste com duas testemunhas: a BR 107 e a BRS 1010. As folhas de amostras intercaladas dos ciclos foram preparadas com as técnicas usuais de microscopia óptica, para a obtenção de dados de anatomia quantitativa. Foram observadas modificações na estrutura dos estômatos e do mesófilo, responsáveis pela manutenção do sistema fotossintético ao longo dos ciclos, modificações no xilema e nos estômatos para a manutenção da condutividade hidráulica e modificações no floema, o que sugere um melhor transporte de fotosintatos. Portanto, os sucessivos ciclos de seleção foram capazes de melhorar a estrutura das plantas para os parâmetros discutidos, sendo os últimos ciclos mais adaptados anatomicamente a regiões alagadas em relação aos primeiros ciclos e ao controle.

Palavras chave: alagamento, anatomia foliar, estrutura e função, milho saracura.

4.2 Abstract - Optimization of the structure and function of the saracura maize BRS 4154 leaves from successive selection cycles, under flooding stress.

Flooding stress is a problem to a great area of farm lands, since it promotes prejudices to small and big producers, and plant growth restrictions. Maize is a low tolerant plant to flooding stress, so the saracura maize cultivar comes like an alternative to the production in that environments. The improvements in the leaf structure and function were analyzed in samples of the 18 selection cycles of that cultivar under intermitent flooding stress. The leaves of the samples of those cycles were prepared under the usual optical microscopy protocols, and quantitative anatomy data were utilized like comparison parameters. We found modifications on the stomata and mesophyll structures to maintain the photosynthetic system along the cycles, alterations in the xylem and in the stomata to maintain the hydraulic conductance and modifications in the phloem to maintain the photosynthesis products transport. So, the successive selection cycles were able to improve the plant's structures to that parameters and the ultimate cycles were the more anatomically adapted in that environments than the initial cycles and control group.

Key words: flooding, leaf anatomy, structure and functions, saracura maize.

4.3 Introdução

As áreas agricultáveis, atualmente, no mundo estão sujeitas a diferentes pressões do ambiente, as quais geram dificuldades para a produção agrícola e florestal, pois limitam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. O alagamento é um desses fatores limitantes e, na América do Sul, ocorrem diferentes biomas que abrigam terras agricultáveis sujeitas a este estresse, como as florestas de galeria, o pantanal e os solos de várzea (Andrade et al., 1999). Estes ambientes se formam temporária ou permanentemente, dependendo do regime pluvial, das cheias de rios e da drenagem do solo, por ação antrópica, devido a uma irrigação excessiva ou à compactação do solo (Kozłowski, 1997).

No Brasil, ocorrem todos esses ambientes e, dessas terras, aproximadamente 28 milhões de hectares possuem potencial para a produção agrícola (Vitorino et al., 2001). Tais regiões podem ser uma importante fonte de renda para pequenos agricultores, que podem aproveitar terras improdutivas ou reduzir os riscos de perda por ação do alagamento em regiões com alta probabilidade deste ocorrer.

As adaptações das plantas nessas condições ocorrem em nível fisiológico com alterações das rotas bioquímicas que, mesmo gerando menos ATP na anaerobiose, pode ser suficiente para a manutenção do meristema apical da raiz e, assim, permitir o seu crescimento (Dew, 1997). As plantas podem, ainda, formar aerênquimas na raiz ou na parte aérea que melhoram a difusão de gases nos tecidos por apoptose celular estimulada por etileno (Kozłowski, 1984).

O milho é classificado como uma planta sensível ao estresse por anoxia e, dessa forma, a produção dessa planta em ambientes sujeitos ao alagamento se tornaria inviável. A variedade Saracura (BRS-4154) foi desenvolvida pela Embrapa Milho e Sorgo para tolerar períodos intermitentes de alagamento e,

assim, tornar possível sua produção nas diversas regiões onde este tipo de estresse está presente (Alves et al., 2002). Esta variedade apresentou melhoramentos quanto à produção e à sobrevivência, provavelmente pela capacidade para o desenvolvimento de aerênquima nas raízes e na parte aérea da planta (Alves et al., 2002). As folhas de milho Saracura sob alagamento exibiram alterações quanto ao diâmetro dos estômatos, à espessura do mesofilo e ao diâmetro dos vasos (Melo et al., 2004).

Este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a melhoria das condições de estrutura e de função das folhas do milho Saracura submetido ao alagamento intermitente, ao longo de 18 ciclos de seleção, verificando, assim, quais os ganhos reais para este órgão e como este incremento pode otimizar a adaptação desta variedade em condições alagadas.

4.4 Material e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação nas áreas experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. O milho Saracura está, atualmente, no seu 18º ciclo anual de seleção, em que é submetido ao alagamento intermitente e as plantas com melhores resultados são selecionadas. Neste experimento, foram codificados como C1 a C18, com a letra C representando o ciclo e o número, o ciclo que a sigla representa.

Foi utilizado solo de várzea, adubado e colocado em vasos com capacidade de 20 kg. Os ciclos escolhidos foram C1, C3, C5, C7, C9, C11, C13, C15, C17 e C18, além do genótipo BR 107, sensível ao alagamento e o híbrido BRS 1010, como testemunhas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, num total 48 de vasos. Foram semeadas seis sementes por vaso no plantio, desbastando-se, mais tarde, para duas plantas.

O início do encharcamento no solo dos vasos foi no estágio de seis folhas completamente desenvolvidas, quando o ponto de crescimento das plantas se encontrava acima do nível da superfície do solo. A adubação em cobertura foi realizada na dosagem de 100 kg ha⁻¹ de N, divididos em 10 aplicações semanais de 10 kg ha⁻¹ de N, (Magalhães et al., 2001). As plantas foram submetidas ao alagamento em intervalos intermitentes de 2 dias, quando os vasos eram completamente encharcados e deixados sem nova adição de água, até a próxima aplicação. A coleta das amostras para anatomia ocorreu em um período de 2 meses em relação à primeira aplicação do alagamento nas amostras.

Foi utilizada uma planta de cada vaso (totalizando 4 repetições para cada tratamento) para a coleta de uma amostra na região do terço médio de duas folhas completamente expandidas, uma imediatamente acima da primeira folha que exibiu sinais de estresse (denominada folha anterior) e outra a dois lances de folha acima (folha posterior). Estes fragmentos das folhas foram fixados em FAA 70 (Johansen, 1940), por 48 horas e, posteriormente, preservados em etanol 70%, até a data das análises. As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. Com o auxílio de micrótomo de mesa, foram realizados cortes transversais nas amostras de folhas e, ainda, cortes paradérmicos manuais das faces abaxial e adaxial das folhas (Melo et al., 2008). Os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio 5%, por 10 minutos (Kraus & Arduin, 1997), reidratados por 10 minutos, os cortes transversais corados com astrablau (solução de safranina e azul de astra) e os cortes paradérmicos corados com safranina 2% e montados em lâminas com glicerina 50%.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico acoplado com câmera digital, com a qual foram realizadas fotografias dos cortes. As fotografias foram utilizadas para as medições dos parâmetros anatômicos em um programa de análise de imagem Imagetool – freeware calibrado com uma régua

microscópica fotografada nos mesmos aumentos das fotografias. Os parâmetros anatômicos mensurados para os cortes paradérmicos foram: densidade estomática nas face adaxial e abaxial, índice estomático nas faces adaxial e abaxial, funcionabilidade estomática nas faces adaxial e abaxial (Calculadas pela divisão do diâmetro polar pelo equatorial) e diâmetro polar dos estômatos das faces adaxial e abaxial. Os parâmetros para a nervura central mensurados foram: número de feixes vasculares, soma do número de vasos de xilema nos feixes, espessura do esclerênquima da nervura central, índice de vulnerabilidade de Carlquist (calculado pela divisão do número de vasos pelo seu diâmetro médio), diâmetro dos vasos de metaxilema, diâmetro das células parenquimáticas e espessura do floema nos feixes vasculares. No mesofilo, as características medidas foram: espessura da epiderme das faces adaxial e abaxial, espessura do mesofilo, espessura da cutícula da face adaxial, diâmetro dos vasos do xilema, espessura do floema, espessura das fibras das faces abaxial e adaxial, número de células buliformes a cada 2 mm e diâmetro polar das células buliformes.

Foram realizadas 4 medições de cada característica anatômica em cada repetição e utilizada a média para definir o valor da característica para cada planta. Nas medições dos estômatos, foram utilizadas as médias das medições de 5 estômatos por repetição.

Os dados foram testados, quanto à normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk e, quanto à homocedacidade, pelo teste de Lavene, todos com distribuição normal e variâncias homogêneas. Foi realizada análise de variância com o teste de F, para detectar as diferenças entre os tratamentos e o teste de Skott-Knott, a 5%, para a separação das diferentes médias.

4.5 Resultados e discussão

A densidade estomática foi alterada na face adaxial das folhas do milho Saracura, em comparação com as testemunhas e em comparação com os ciclos iniciais. Houve um aumento em 61% nos últimos ciclos e de 104% no C13, em relação ao grupo controle e aos ciclos iniciais de seleção. Na face abaxial, o comportamento foi diferenciado e com valores maiores do que na face adaxial. Ainda assim ocorreu aumento na densidade estomática de 71% em relação ao híbrido BRS 1010, no entanto, a variedade BR 107 exibiu médias iguais às dos ciclos de seleção, exceto nos ciclos C7, C11 e C13, que demonstraram médias iguais às do BR 1010 (Tabela 1 e Figura 1).

Todos esses valores estão acima da média observada para os estômatos em uma folha completamente expandida de milho sob condições normais, que é de 30 a 50 estômatos por mm^2 (Kolodziejek et al., 2006). Tais resultados indicam que as plantas de milho Saracura exibiram adaptações à condição de alagamento com maior densidade estomática em resposta ao estresse ambiental. As plantas que estão sob estresse por alagamento podem exibir inibições na taxa fotossintética causada pela diminuição da quantidade de CO_2 encontrada nas plantas nessas condições (Kozlowski, 1997).

Dessa forma, pode-se observar que um aumento na densidade estomática pode promover um incremento na área disponível para trocas gasosas e, assim, disponibilizar maior quantidade de CO_2 para a fotossíntese. Portanto, um aumento na densidade estomática é um fator adaptativo interessante para plantas sob alagamento e seu incremento pode ser considerado um avanço genético, quanto à adaptabilidade e uma característica desejável nas plantas desta variedade.

O aumento do índice estomático observado na face adaxial pode ser relacionado aos argumentos discutidos para o aumento da densidade estomática (Tabela 1 e Figura 1). O maior índice estomático indica que houve aumento, em porcentagem, quanto ao número de estômatos em relação ao total de células

epidérmicas. Este fato mostra um investimento das plantas em produção de estômatos para otimizar o aproveitamento da área da epiderme para trocas gasosas. É, portanto, um fator que corrobora as sugestões de que um aumento na área disponível para absorção de CO₂ é realmente importante para as plantas que estão crescendo nessas condições. No entanto, na face abaxial ocorreu uma redução neste parâmetro, demonstrando comportamentos diferenciados para as faces da folha do milho Saracura.

A funcionabilidade estomática foi aumentada nos últimos ciclos em relação à variedade BR 107 e no último ciclo em relação aos primeiros e ao híbrido BRS 1010 (Tabela 1 e Figura 1). Este é outro fator que pode ser relacionado com a otimização da captação de CO₂ pelas folhas, pois estômatos mais funcionais permitem a captação deste gás com uma abertura menor ou mais rápida.

O mesmo pode ser observado quanto ao aumento no diâmetro polar do estômato, que aumentou, nos últimos ciclos, em relação à variedade BR 107 (Tabela 1 e Figura 1). Este parâmetro está diretamente relacionado com uma maior funcionabilidade dos estômatos e o seu aumento de 16% na face abaxial e de 14% na adaxial foi relevante para a melhor adaptação do milho Saracura ao longo dos ciclos sucessivos de seleção. Todo este investimento para a captação de CO₂ é importante para as plantas de milho na produção de carboidratos pela fotossíntese, os quais serão utilizados para a produção de ATP, que possibilitará a manutenção da planta no ambiente alagado (Taiz & Zeiger, 2004). Eles serão utilizados, ainda, para o enchimento de grãos de milho, produto final de interesse agrícola da planta.

Tabela 1. Dados estomáticos de plantas de milho saracura de sucessivos ciclos de seleção, submetidas ao alagamento.

Ciclos	Face Adaxial				Face Abaxial			
	DE	IE	FUN	POL (μm)	DE	IE	FUN	POL (μm)
C1	082 c	0,19 b	4,62 b	47,98 a	133 a	0,28 a	4,06 c	39,31 b
C3	079 c	0,18 b	4,92 b	46,98 a	123 a	0,29 a	4,38 c	43,53 b
C5	093 c	0,20 b	3,73 c	43,17 b	130 a	0,29 a	4,17 c	42,98 b
C7	073 c	0,19 b	4,42 b	50,24 a	105 b	0,25 a	4,76 c	43,03 b
C9	082 c	0,19 b	4,40 b	44,72 b	120 a	0,27 a	4,70 c	44,58 a
C11	082 c	0,20 b	4,53 b	46,64 b	082 b	0,22 b	4,10 c	48,38 a
C13	129 a	0,26 a	3,82 c	41,67 b	093 b	0,19 b	4,47 c	45,29 a
C15	096 b	0,22 a	3,88 c	43,75 b	130 a	0,29 a	3,85 c	45,57 a
C17	102 b	0,23 a	4,40 b	45,13 a	118 a	0,24 b	4,89 b	46,38 a
C18	100 b	0,22 a	6,45 a	49,00 a	111 a	0,21 b	6,02 a	49,26 a
Br 107	087 c	0,19 b	4,20 c	41,92 b	115 a	0,26 a	4,20 c	41,10 b
Brs1010	063 c	0,17 b	5,03 b	47,83 a	076 b	0,22 b	5,08 b	47,45 a

DE= densidade estomática n° por mm², IE=índice estomático na face adaxial, FUN funcionabilidade estomática, POL= diâmetro polar dos estômatos da face adaxial. As letras diferentes nas colunas correspondem a medias diferentes pelo teste de Skott-Knott a 5%.

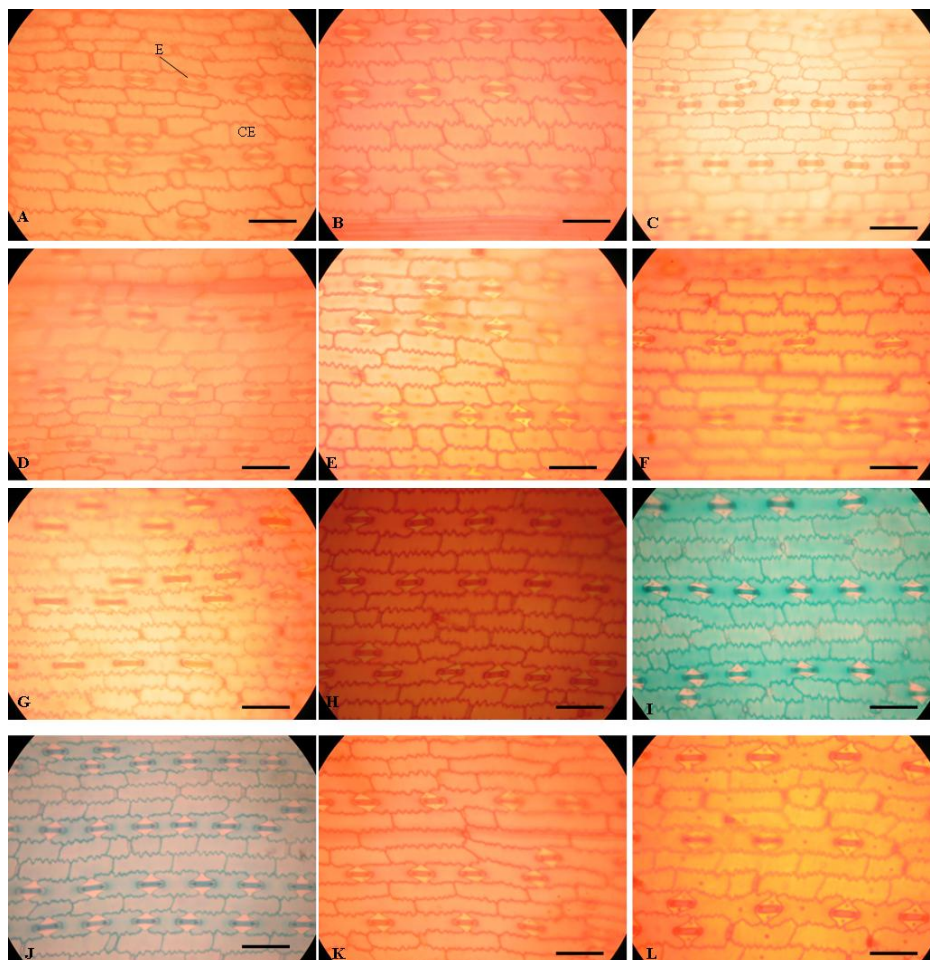


Figura 1. Diferenças nos estômatos de ciclos de seleção do milho saracura submetidos ao alagamento e de dois grupos controle. A= C1, B= C3, C= C5, D= C7, E= C9, F= C11, G= C13, H= C15, I= C17, J= C18, K= BR107, L=BRS 1010. **E**= estômato, **CE**= célula epidérmica. A barra indica 50 µm.

O número de feixes vasculares da nervura central foi aumentado, nos ciclos de seleção do milho Saracura, em 62%, comparando-se os últimos ciclos em relação com o BRS 1010 e 44% em comparação com os primeiros ciclos de seleção (Tabela 2). Como os feixes vasculares são compostos pelos tecidos

condutores, um aumento no número de feixes vasculares traz, diretamente, um aumento nos vasos de xilema e no floema.

O aumento do número de vasos do xilema é um fator que está associado à proteção do sistema hidráulico da planta, pois pode preservar a condutividade hidráulica por compensar os vasos que estão com cavitação por aqueles em perfeito estado, um fato associado a plantas de ambientes xéricos ou sob estresse (Denardi & Machiori, 2005). Contudo, o NF pode também estar relacionado a uma melhor distribuição da água no mesófilo e, certamente, com a proteção do sistema hidráulico da planta, evitando a cavitação (Sack & Holbrook, 2006). Tal fato foi acompanhado diretamente pelo aumento no número de vasos de xilema presentes na nervura central (Tabela 2).

Com estas informações pode-se considerar o aumento no NF e NV como uma adaptação à condição de estresse por alagamento por melhorar a condutividade hidráulica da folha e da planta como um todo.

Tabela 2. Características anatômicas da nervura central das folhas de plantas oriundas de sucessivos ciclos de seleção do milho saracura submetidos ao alagamento.

<i>Ciclos</i>	<i>NF</i>	<i>NV</i>	<i>DV (µm)</i>	<i>IVC</i>	<i>FL (um)</i>	<i>CP (µm)</i>	<i>EC (µm)</i>
C1	09 b	12 b	64,88 a	03,75 c	72,12 a	105,33 c	078,15 b
C3	07 b	07 c	63,02 a	11,34 a	62,87 b	136,95 b	072,28 b
C5	09 b	09 c	64,89 a	07,23 b	78,12 a	104,73 c	101,31 b
C7	10 a	11 b	50,87 b	05,23 b	59,18 b	121,70 b	114,30 b
C9	08 b	12 b	62,09 a	04,95 b	75,90 a	135,99 b	108,48 b
C11	08 b	15 a	54,58 b	03,76 c	60,91 b	131,52 b	116,23 b
C13	07 b	13 b	50,47 b	03,75 c	65,12 b	153,34 a	128,74 a
C15	08 b	12 b	47,89 b	03,90 c	77,44 a	133,21 b	126,66 a
C17	13 a	17 a	49,29 b	02,97 c	85,12 a	127,86 b	091,81 b
C18	12 a	16 a	45,67 b	02,87 c	79,02 a	145,56 a	054,89 b
BR107	11 a	08 c	57,10 a	06,80 b	67,19 b	102,35 c	111,96 b
BRS1010	08 b	06 c	70,70 a	11,95 a	77,83 a	093,97 c	144,09 a

NF= número de feixes vasculares, NV= soma do número de vasos de xilema nos feixes, DV= diâmetro dos vasos de xilema, IVC= índice de vulnerabilidade de Carlquist, FL= espessura do floema nos feixes vasculares, CP= diâmetro das células parenquimáticas, EC= espessura do esclerênquima da nervura central. As letras diferentes nas colunas correspondem a médias diferentes pelo teste de Skott-Knott a 5%.

A diminuição de 35% em relação ao grupo controle e a de 29% em relação aos primeiros ciclos do diâmetro dos vasos condutores do xilema observados na nervura central das folhas de milho Saracura sob alagamento (Tabela 2) estão também diretamente relacionadas à preservação do sistema vascular, quanto à condutividade hidráulica. A diminuição do diâmetro dos vasos é uma característica que evita a cavitação, por proporcionar melhor condução da água ao longo dos vasos do xilema, que segue o fluxo transpiratório, tocando as paredes dos elementos de vaso do xilema, impedindo, assim, a formação de espaços por onde o ar pode penetrar e formar bolhas (Hacke & Sperry, 2001). Dessa forma, observa-se diminuição no IVC ao longo dos ciclos, ilustrando a melhoria na proteção do sistema condutor das folhas das plantas de milho Saracura ao longo dos ciclos de seleção (Tabela 2). Estes fatos são importantes para a caracterização de plantas que são favoráveis ao plantio em solo alagado, pois alguns dos primeiros problemas ocorrerão no sistema hidráulico da planta que, se prejudicado, afetará toda a sua fisiologia. Portanto, os últimos ciclos de seleção demonstram uma melhoria em relação aos primeiros, confirmando as melhorias obtidas com os sucessivos ciclos de seleção.

Ainda associados aos feixes vasculares pode-se observar um aumento na espessura do floema dos últimos ciclos de seleção em 35% em relação aos primeiros ciclos e à variedade BR 107 (Tabela 2). Este favorecimento do floema ocorre devido a uma necessidade das plantas de manterem níveis adequados de carboidratos para serem utilizados como substrato do metabolismo aeróbio e anaeróbio, principalmente na raiz (Liao & Lin, 2001). O aumento da espessura do floema pode ser relacionado à melhoria do sistema vascular para ao fluxo de fotosintatos da folha para o restante da planta, melhorando o transporte e, conseqüentemente, possibilitando que toda a planta se adapte ao estresse. Este é

ainda um fator vital para o enchimento das cariopses e a relação fonte-dreno pode ser melhorada, possibilitando uma melhor produção de carboidratos a serem deslocados para estes órgãos. Esta é uma importante característica adquirida pelas plantas ao longo dos ciclos de seleção.

O diâmetro das células parenquimáticas sofreu aumento de 55%, no último ciclo de seleção, em relação ao grupo controle e 38% em relação aos ciclos iniciais (Tabela 2). Essas alterações nas células parenquimáticas podem estar relacionadas ao aumento da área delimitada pelo espaço intercelular e esse fato pode ser importante para o armazenamento de gases respiratórios. Como não houve a formação de aerênquimas neste tecido, pode-se considerar este aumento no espaço intercelular como uma adaptação foliar das plantas ao alagamento.

Houve redução da espessura da epiderme foliar, tanto da fase adaxial (14,45%) quanto da abaxial (26,0%) dos últimos ciclos de seleção, em relação às testemunhas. Houve também redução de 21% na espessura do mesofilo ao longo dos ciclos de seleção (Tabela 3 e Figura 2). Estes resultados contribuíram para uma redução de 20,75% na espessura total das folhas do ciclo C18, em relação às testemunhas, demonstrando uma significativa alteração nesta característica. Os efeitos da redução do limbo foliar na fisiologia da planta são discutidos principalmente quanto à função de aproveitamento da energia luminosa pela fotossíntese.

É estabelecido que as plantas de ambiente com baixa irradiância desenvolvem espessura foliar reduzida, junto com maior área foliar para melhor aproveitar a radiação solar disponível (Melo et al., 2007). Neste experimento, a diminuição da espessura foliar pode ser comparada a esta redução das plantas em ambiente de baixa irradiância. Neste caso, a diminuição da taxa fotossintética sob alagamento deve ser compensada pela diminuição da espessura foliar e o aumento da área foliar para um melhor aproveitamento da

energia radiante e do CO₂ disponível para a fotossíntese. Apesar de ser um fator adaptativo bastante plástico nas plantas, os sucessivos ciclos de seleção exibiram redução da espessura foliar, sendo possível observar claramente um ganho em adaptação dos últimos ciclos seletivos em relação aos iniciais.

A diminuição da espessura da cutícula (Tabela 3 e Figura 2) pelos ciclos de seleção pode ser atribuída a uma diminuição do investimento energético dessas plantas para o isolamento da epiderme e, assim, reduzir a produção de lipídeos destinados a este fim. Como discutido, com a redução das taxas fotossintéticas, toda diminuição no gasto energético pode ser investida no correto crescimento e na posterior reprodução, em que ocorrerá o desenvolvimento das flores e cariopses características decisivas para a produção final de grãos.

Ocorreu redução de 32% na espessura das fibras da face adaxial dos feixes vasculares foliares e de 29,9% na face adaxial dos ciclos de seleção, em relação ao híbrido BRS 1010 (Tabela 3 e Figura 3). Esta redução possibilita a formação de tecidos vasculares, mais importantes, como o floema, que teve aumento de 11% nos últimos ciclos. Este aumento na espessura do floema, como já discutido para a nervura central, aumenta a capacidade de condução dos fotossintatos para o restante da planta, ajudando na sobrevivência da mesma e melhorando sua capacidade para a produção de grãos. O diâmetro do xilema sofreu algumas alterações nos ciclos, mas não houve um padrão com aumento ou diminuição significativa de seus valores (Tabela 3 e Figura 3).

Tabela 3. Dados do limbo foliar e dos feixes vasculares de ciclos de seleção do milho saracura e dos grupos controle.

Ciclo	EAD (μm)	EAB (μm)	MF (μm)	CUT (μm)	FAB (μm)	FAD (μm)	FL (μm)	DV (μm)	NCB	DCB (μm)
C1	22,5 b	19,1 b	121 c	08,1 b	30,8 c	38,3 c	47,4 c	46,3 b	11 b	107 a
C3	23,7 b	14,6 b	123 c	08,1 b	27,3 c	31,9 c	48,5 c	46,3 b	08 b	117 a
C5	29,5 a	18,3 b	187 a	10,7 a	32,6 c	36,3 c	61,2 a	50,3 b	09 b	116 a
C7	21,6 b	15,5 b	117 c	07,5 b	34,9 c	36,3 c	37,0 d	51,3 b	09 b	097 b
C9	24,0 b	19,1 b	138 c	05,8 c	41,3 b	45,8 b	60,5 a	64,9 a	09 b	111 a
C11	22,4 b	21,5 a	143 c	05,8 c	37,8 c	41,4 b	65,3 a	48,1 b	09 b	112 a
C13	29,7 a	21,2 a	152 b	05,2 c	32,3 c	33,6 c	53,4 b	45,9 b	09 b	091 b
C15	25,7 b	24,2 a	168 a	06,1 c	48,2 a	55,8 a	55,0 b	71,5 a	08 b	087 b
C17	24,4 b	17,8 b	132 c	05,6 c	31,2 c	36,9 c	56,5 b	47,5 b	08 b	082 b
C18	24,9 b	18,1 b	125 c	03,5 d	35,4 c	38,4 c	52,6 b	45,3 b	07 b	074 b
BR 107	27,4 a	18,2 b	148 b	04,5 d	25,2 c	33,9 c	53,2 b	43,6 b	14 a	096 b
BRS1010	28,5 a	24,5 a	159 b	06,1 c	37,2 b	48,4 b	46,8 c	56,8 b	15 a	087 b

EAD= espessura da epiderme adaxial, EAB= espessura da epiderme abaxial, MF= espessura do mesofilo, CUT= espessura da cutícula, FAB= espessura das fibras da face abaxial, FAD= espessura das fibras da face adaxial, FL= espessura do floema, DV= diâmetro dos vasos do xilema, NCB= número de células buliformes a cada 2 mm, DCB= Diâmetro polar das células buliformes. As letras diferentes nas colunas correspondem a médias diferentes pelo teste de Skott-Knott a 5%.

Houve redução no número de células buliformes ao longo de uma determinada distância no limbo foliar, em comparação com o grupo controle (Tabela 3) e diminuição nos seus diâmetros polares ao longo dos ciclos de seleção, até atingirem valores estatisticamente semelhantes aos do grupo controle (Tabela 3). As células buliformes são relacionadas ao enrolamento das folhas (Melo et al., 2007) destas poáceas e podem ser importantes para a manutenção da turgidez foliar, impedindo o excesso de transpiração, dobrando as folhas e, assim, diminuindo a área exposta ao ambiente.

Observando-se esta função de tais células e as modificações relacionadas à otimização da captação de CO₂ para a fotossíntese neste trabalho, pode-se facilmente deduzir que uma redução no número de células buliformes aqui observadas permite que as folhas dessas plantas de milho Saracura exponham uma maior área foliar para a captação deste gás e o aproveitamento da luz para a fotossíntese. Dessa forma, observa-se que a diminuição das células buliformes pode ser interessante, como característica adaptativa para as plantas de milho Saracura.

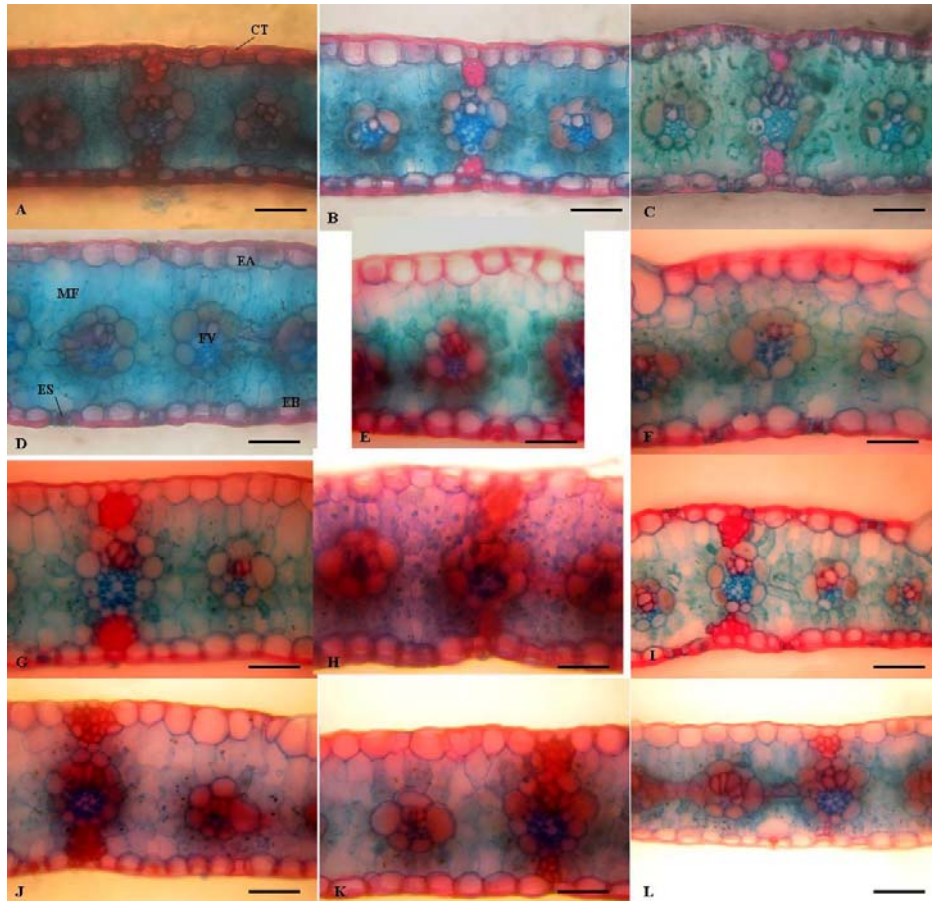


Figura 2. Seções transversais do limbo foliar de plantas de milho saracura submetidas ao alagamento e em duas testemunhas. CT= cutícula, EA= epiderme adaxial, MF= mesofilo, FV= feixe vascular, EB= Epiderme abaxial, ES= estômato. A= C1, B= C3, C= C5, D= C7, E= C9, F= C11, G= C13, H= C15, I= C17, J= C18, K= BR107, L=BRS 1010. A barra indica 50 µm.

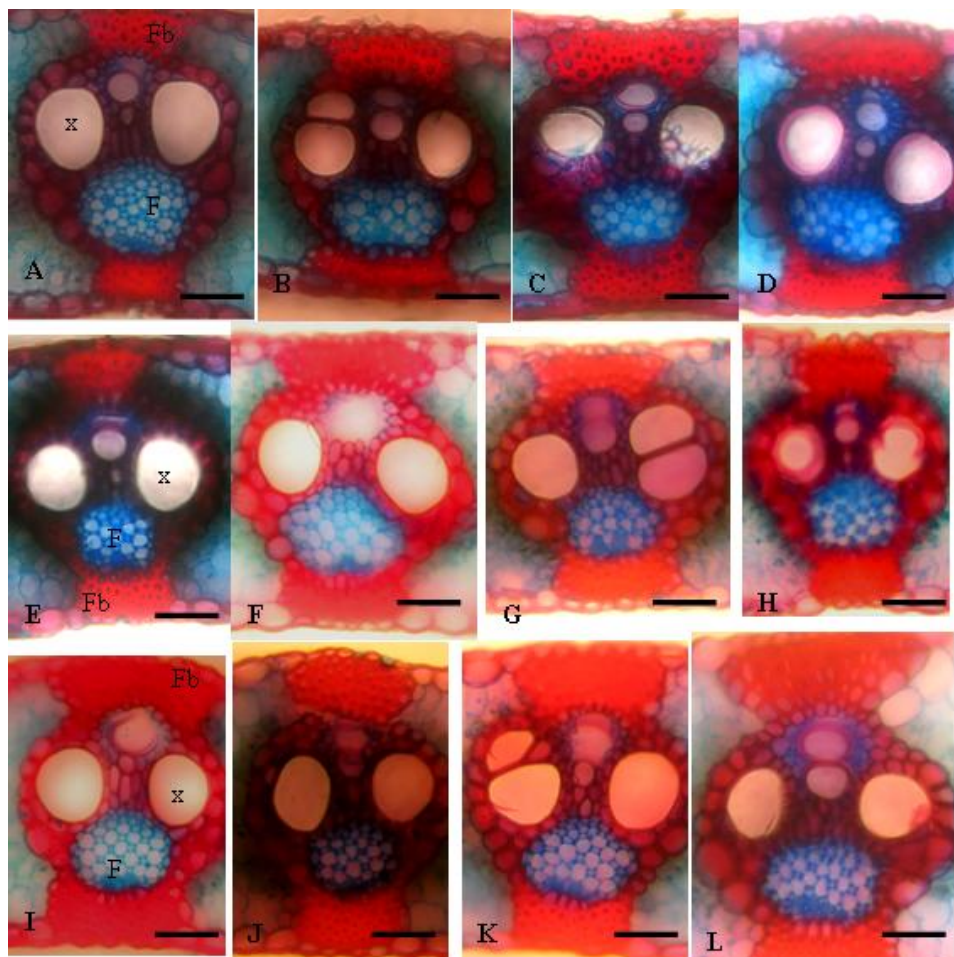


Figura 3. seção transversal dos feixes vasculares de ciclos de seleção do milho saracura e duas testemunhas. Fb= fibras, X= xilema(Metaxilema), F= floema. A= C1, B= C3, C= C5, D= C7, E= C9, F= C11, G= C13, H= C15, I= C17, J= C18, K= BR107, L=BRS 1010. A barra indica 50 μ m.

4.6 Conclusões

Os dados demonstram que houve evolução na estrutura das folhas de plantas de milho Saracura ao longo dos ciclos de seleção. Esta evolução foi progressiva nos parâmetros analisados, demonstrando que os últimos ciclos de seleção são morfologicamente mais aptos a preservar a fotossíntese, a condutividade hidráulica e o transporte no floema das plantas, em relação aos ciclos anteriores.

4.7 Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de mestrado (F. J. Pereira). À Embrapa Milho e Sorgo, pelo financiamento do projeto.

4.8 Referências Bibliográficas

ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; GOULART, P. F. P.; DANTAS, B. F.; GOUVÊA, J. A.; PURCINO, R. P.; MAGALHÃES, P. C.; FRIES, D. D.; LIVRAMENTO, D. E.; MEYER, L. E.; SEIFFERT, M.; SILVEIRA, T. Mecanismos de tolerância da variedade de milho “Saracura” (BRS 4154) ao encharcamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete lagoas, v. 1, n. 1, p. 33-40, jan. 2002.

ANDRADE, A. C. S.; RAMOS, F. N.; SOUZA, A. F.; LOUREIRO, M. B.; BASTOS, R. Flooding effects in seedlings of *Cytherexylum myrianthum* Cham. and *Genipa americana* L.: responses of two neotropical lowland tree species. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 281-285, ago. 1999. Suplemento.

DENARDI, L.; MACHIORI, J. N. C. Anatomia Ecológica da Madeira de *Blepharocalyx salicifolius* (H. B. K.) Berg. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 2, p. 19-127, dez. 2005.

DEW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 223-250, June 1997.

HACKE, U. G.; SPERRY, J. S. Functional and Ecological Xylem Anatomy. **perspectives in Plant Ecology, Evolution and Sistematics**, Zurich, v. 4, n. 2, p. 97-115, jan. 2001.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 300 p.

KOŁODZIEJEK, I.; WALEZA, M.; MOSTOWSKA, A. Morphological, histochemical and ultrastructural indicators of maize and barley leaf senescence. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 50, n. 4, p. 565-573, Oct./Dec. 2006.

KOZŁOWSKI, T. T. Plant Responses to Flooding of Soil, **BioScience**, Washington, v.34, n.3, p.162-167, Jan. 1984.

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

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. 221 p.

LIAO, C. T.; LIN, C. H. Physiological Adaptation of Crop Plants to Flooding Stress, **Proceedings of National Science Council**, Beijing, v. 25, n. 3, p. 148-157, Apr. 2001.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; ANDRADE, C. de L. T. de; OLIVEIRA, A. C. de; SOUZA, I. R. P. de; GAMA E. E. G. Adaptação do milho a diferentes condições de alagamento. In: CONGRESSO NACIONAL DE FISILOGIA VEGETAL, n.8., 2001, Ilhéus. **Anais...** Ilhéus: CNFV, 2001. 1 CD-ROM.

MELO, H. C.; CASTRO, E. M.; ROMERO, J. L.; ALVES, J. D.; FRIES, D. D.; MELO, L. A.; MAGALHÃES, P. C. Influência da aplicação de cálcio e alagamento do solo sobre as 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, set./dez. 2004.

MELO, H. C.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.; MELO, L. A.; ALVES, J. D. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 145-153, jun. 2007.

SACK, L.; HOLBROOK, N. M. Leaf Hydraulics. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, n. 3, p. 61-81, jun. 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 672 p.

VITORINO, P. G.; ALVES, J. D.; MAGALHÃES, P. C.; MAGALHÃES, M. M.; LIMA, L. C. O.; OLIVEIRA, L. E. M. Flooding tolerance and cell wall alterations in maize mesocotyl during hypoxia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 8, p. 1027-1035, ago. 2001.

5 CAPÍTULO 3:

Influência de ciclos de seleção milho (*Zea mays* L.) ‘Saracura BRS-4154’ na atividade de enzimas antioxidativas das raízes

(preparado segundo as normas da revista Acta Botânica Brasilica)

Fabricio José Pereira⁹¹⁰, Evaristo Mauro de Castro¹, Paulo César Magalhães¹¹,
Thiago Corrêa de Souza¹

⁹ Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Campus Universitário, Lavras-MG, caixa postal 37, CEP 37200-000.

¹⁰ Autor para correspondência: fjprock@hotmail.com

¹¹ Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, Caixa postal -151, CEP 37701-970.

5.1 Resumo

O alagamento pode levar à produção de diferentes espécies reativas de oxigênio que causam prejuízos para o metabolismo da planta e, conseqüentemente, para a produção. Enzimas antioxidantes atuam na remoção de espécies reativas de oxigênio e ajudam na adaptabilidade da planta. Este trabalho foi realizado como o objetivo de avaliar a influência de ciclos sucessivos de seleção do milho Saracura sob encharcamento intermitente do solo na atividade das peroxidases do ascorbato e guaiacol, da catalase e da pepcase das raízes dessas plantas. A atividade da ascorbato peroxidase e da guaiacol peroxidase foi aumentada ao longo dos ciclos de seleção, em detrimento da catalase como enzima de remoção do H₂O₂ potencialmente tóxico. A atividade da enzima pepcase foi aumentada ao longo dos ciclos sucessivos. Portanto, os sucessivos ciclos de seleção promoveram melhorias na maquinaria enzimática das plantas de milho Saracura.

Palavras chave: alagamento, peroxidase, guaiacol, ascorbato, catalase, pepcase.

5.2 Abstract – The influence of successive selection cycles of saracura maize BRS-4154 (*Zea mays* L.) in the activity of antioxidative enzymes of roots.

Flooding stress could led to the production of differents reactive oxygen species, that cause damage to the plant metabolism and therefore to the production. The antioxidative enzymes act in the removal of the reactive oxygen species and help in the plant adaptability. This work aimed to evaluated the influence of the sucessive selection cycles of saracura maize under intermitent flooding stress in the activity of the: peroxidases of ascorbate and guaiacol, catalase, and pepcase from the roots. The ascortabe and guaiacol peroxidase activity were increased along the sucessive selection cycles, on the contrary, the catalase activity were reduced like the principal enzyme envolved in the potentially toxic H₂O₂ removal. The pepcase activity were increased along the sucessive selection cycles. Thence, the sucessive selection cycles promote the improvement in the enzyme machinery of the saracura maize plants.

Key words: flooding, peroxidase, guaiacol, ascorbate, catalase, pepcase.

5.3 Introdução

O estresse por alagamento é um fator ambiental comum em diversas áreas com potencial para a agricultura. São vários os ambientes em que este fator pode se desenvolver, representando limitações para a agricultura e a silvicultura. Tais ambientes podem ser naturais ou, ainda, se desenvolver pela ação do homem. No Brasil, cerca de 28 milhões de hectares são compostos por estes ambientes (Andrade et al., 1999; Kozłowski, 1997; Vitorino et al., 2001).

O alagamento pode levar à anoxia ou à hipoxia e à expressão de proteínas específicas de estresse anaeróbico, denominadas ANPs (Liao & Lin, 2001). O metabolismo das plantas é então deslocado para a anaerobiose e ocorre diminuição da produção de ATP. Esta redução leva a prejuízos no crescimento e no desenvolvimento. Ocorrem, ainda, alterações no metabolismo da planta, para compensar a redução na disponibilidade de energia (Kozłowski, 1984; Dew, 1997).

O milho é uma espécie sensível ao estresse por anoxia, impossibilitando a sua produção em áreas sujeitas a este fator. Contudo, a cultivar Saracura BRS-4154 foi desenvolvida pela Embrapa Milho e Sorgo para um melhor desempenho nessas condições e exibiu muitas características favoráveis à sobrevivência e ao crescimento, como, por exemplo, modificações na anatomia e no metabolismo (Alves et al., 2002; Ferrer et al., 2004; Melo et al., 2004).

Em condições de estresse por hipoxia ou anoxia ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem atuar como sinalizadores celulares ou, ainda, causar prejuízos ao metabolismo celular pela oxidação de proteínas e lipídios, ou, ainda, gerar mutações e problemas reprodutivos pela oxidação do DNA (Moller et al., 2007; Foyer et al., 1997).

Uma forma de defesa das plantas a essas condições é a expressão de enzimas encarregadas da remoção das Eros, que são formadas excessivamente,

impedindo seus efeitos nocivos. Assim, enzimas das classes das peroxidases, do ciclo do ascorbato e a catalase são importantes na preservação das propriedades fisiológicas das plantas sob estresse por alagamento (Moller et al., 2007).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar como a intensidade do alagamento e de ciclos sucessivos de seleção do milho Saracura pode exercer influência na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo das Eros e, conseqüentemente, na fisiologia do estresse oxidativo nestas plantas.

5.4 Material e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação nas áreas experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. O milho Saracura está, atualmente, no 18º ciclo anual de seleção, no qual é submetido ao alagamento intermitente e as plantas com melhores resultados são selecionadas. Neste experimento foram codificados como C1 a C18, em que a letra C representa o ciclo e o número, o ciclo que a sigla representa.

Foi utilizado solo de várzea, adubado e colocado em vasos com capacidade de 20 kg. Os ciclos escolhidos foram C1, C3, C5, C7, C9, C11, C13, C15, C17 e C18, além dos genótipos BR 107, sensível ao alagamento e o híbrido BRS 1010, como testemunha. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, perfazendo um total 48 de vasos. Foram semeadas seis sementes por vaso no plantio, desbastando-se, mais tarde, para duas plantas.

O início do encharcamento no solo dos vasos foi no estágio de seis folhas completamente desenvolvidas, quando o ponto de crescimento das plantas se encontrava acima do nível da superfície do solo. A adubação em cobertura foi realizada na dosagem de 100 kg ha⁻¹ de N, divididos em 10 aplicações semanais de 10 kg ha⁻¹ de N (Magalhães et al., 2001). As plantas forma submetidas ao

alagamento em intervalos intermitentes de 2 dias, QUANDO os vasos eram completamente encharcados e deixados sem nova adição de água, até a próxima aplicação. A coleta das amostras para anatomia ocorreu em um período de 2 meses em relação à primeira aplicação do alagamento nas amostras.

A coleta das raízes para a extração enzimática ocorreu em uma planta por vaso da casa de vegetação, totalizando 4 plantas por tratamento. As plantas foram removidas dos vasos, as raízes lavadas em água corrente até a completa remoção do solo e uma amostra de cerca de 3g de raízes foi imediatamente cortada, envolvida em papel alumínio e mergulhada em nitrogênio líquido. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em freezer, a -86°C , até a data das análises enzimáticas.

O extrato enzimático foi realizado com 0,9 mL de um tampão de extração composto de: 883,8 μL de tampão fosfato 0,1M pH 7, EDTA 0,1M na quantidade de 9 μL , DTT 0,5 M na quantidade de 3,6 μL , PMSF 0,1M na quantidade de 7,2 μL e, ainda, 18 mg de PVPP. Foram utilizados 0,3 g das raízes, maceradas em nitrogênio líquido e centrifugadas, a 14000 RPM, por 20 minutos, a 4°C . O sobrenadante contendo as enzimas foi coletado e o pellet descartado (Bor et al., 2003 adaptado). Todo o processo de extração foi realizado a 4°C e as amostras foram preservadas no congelador, ao longo das análises.

A atividade da peroxidase do guaiacol foi analisada com a adição de 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6, um volume de 16,7 μL de guaiacol 0,2 M, um volume de 13,3 μL de H_2O_2 0,03 M e 20 μL do extrato enzimático (Nakano & Asada, 1981 adaptado). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento do aumento da absorbância a 290 nm por 2 min em intervalos de 15 segundos, e o fator de extinção de $26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

A atividade da peroxidase do ascorbato foi analisado com a adição de 0,9 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7, 16,7 μL de ácido ascórbico 0,01

M, 13,3 μL de H_2O_2 0,03 M e 20 μL do extrato enzimático (Nakano & Asada, 1981 adaptado). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento da queda da absorbância, a 470 nm, por 2 minutos, em intervalos de 15 segundos e o fator de extinção de $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

A atividade da catalase foi analisada com a adição de 0,98 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7, H_2O_2 0,0125 M dissolvida no tampão e 20 μL do extrato enzimático (Madhusudhan et al., 2003 adaptado). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento da queda da absorbância, a 240 nm, por 2 minutos, em intervalos de 15 segundos, e o fator de extinção de $36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

A atividade da PEPCASE foi analisada com a adição de 0,56 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7, 20 μL de 2-mercaptoetanol 0,5 M, 100 μL de malato desidrogenase 208,8 u/mL, 100 μL de glicose 6-P 0,05 M, 100 μL de NADH 2 mM e 20 μL do extrato enzimático (Ferrer et al., 2005 adaptado). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento da queda da absorbância, a 340 nm, por 2 minutos, em intervalos de 15 segundos, e o fator de extinção de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Os dados foram testados, quanto à normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk e, quanto à homocedacidade, pelo teste de Lavene, sendo todos com distribuição normal e variâncias homogêneas. Foi realizada análise de variância com o teste de F para detectar as diferenças entre os tratamentos e o teste de Skott-Knott, a 5%, para a separação das diferentes médias.

5.5 Resultados e discussão

A análise dos resultados obtidos para a enzima guaiacol peroxidase demonstraram grande variação na atividade dessa enzima ao longo dos diferentes ciclos (Figuras 1 e 2). Tais resultados podem ser explicados pela

variabilidade genética presente ao longo dos diferentes ciclos. Isto gera comportamentos variados e pode não levar a um ganho gradativo, no decorrer dos ciclos seletivos. Outra explicação pode ser o papel sinalizador efetuado pelo H_2O_2 (Moller et al., 2007). Este composto é removido pela guaiacol peroxidase com a oxidação do guaiacol pela enzima e, neste processo, pode ser impedido de realizar a sinalização para o estresse oxidativo.

Sem a sinalização, a planta pode ter dificuldades de responder ao estresse e melhorar a sua adaptabilidade. Sendo assim, os últimos ciclos podem ter exibido uma atividade menor do que a dos ciclos intermediários, por preservarem as funções sinalizadoras e manterem os níveis deste composto até um limite tolerável, otimizando assim a sua função.

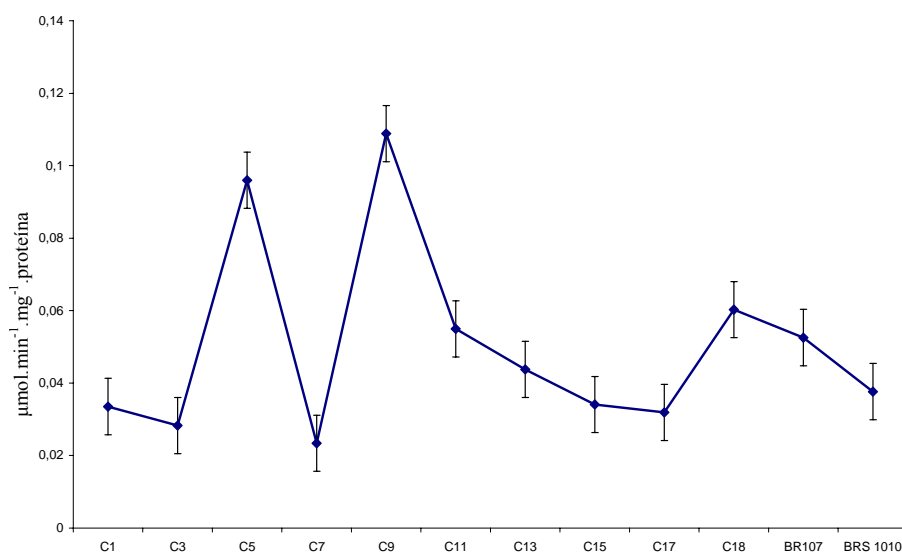


Figura 1. Resultado da análise das atividades da enzima guaiacol peroxidase na raiz de plantas em diferentes ciclos de seleção do Milho Saracura submetidas ao alagamento. As barras indicam o erro padrão.

O comportamento da enzima ascorbato peroxidase ao longo dos sucessivos ciclos exibiu um aumento em relação aos primeiros ciclos e ao grupo controle (Figura 2). Observando-se os resultados da Figura 2, fica claro que os sucessivos ciclos de seleção promoveram um incremento na atividade da ascorbato peroxidase e os últimos ciclos são mais eficazes para a remoção do H_2O_2 , por ação desta enzima.

Estes fatos demonstram que a atividade dessa enzima pode estar relacionada a uma sinalização para a sua expressão (com o H_2O_2 sinalizando para fatores de transcrição da enzima) ou os níveis de H_2O_2 no substrato devem estar relativamente altos para que a mesma entre em atividade. Assim, se a primeira hipótese for verdadeira, podemos entender que as plantas crescidas sob alagamento expressaram mais peroxidases do ascorbato em seu desenvolvimento, estas foram extraídas e exibiram alta atividade quando em contato com seus substratos no meio de incubação. Sendo H_2O_2 um reconhecido sinalizador para a expressão de proteínas (Moller et al., 2007) pode-se concluir que um estado de intensa hipoxia leva a grande formação deste composto e este ativa a expressão de ascorbato peroxidase.

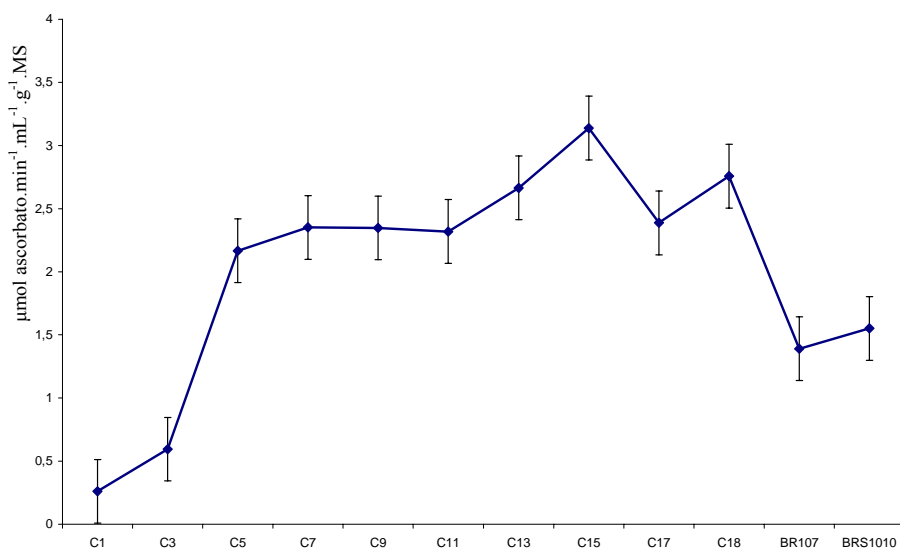


Figura 2. Resultado da análise das atividades da enzima ascorbato peroxidase na raiz de plantas em diferentes ciclos de seleção do Milho Saracura submetidas ao alagamento. As barras indicam o erro padrão.

A atividade da catalase nos ciclos de seleção do milho Saracura foi reduzida ao longo dos ciclos de seleção, com valores menores para os últimos ciclos em relação aos iniciais. A diminuição da atividade da catalase ao longo dos ciclos pode ter acontecido por uma competição por substrato com as peroxidases descritas acima e, como houve um favorecimento da expressão da ascorbato peroxidase nos últimos ciclos, o investimento da planta pode ter ocorrido na expressão desta enzima e deixado as catalases parcialmente restritas. Assim, o investimento na ascorbato peroxidase é interessante, pois esta é a enzima com maior capacidade de limpar o citosol do H_2O_2 (Madhusudhan et al., 2003).

A redução na atividade das catalases pode ser um fator positivo para as plantas de milho Saracura, se o investimento na ascorbato peroxidase for uma forma mais eficaz de impedir os danos causados pelo acúmulo de H_2O_2 e a conseqüente formação de radicais mais nocivos como o OH^\cdot formado na reação

de Fenton a partir de H_2O_2 . Dessa forma, menor produção (em moles) de enzima pode ser capaz de reduzir efetivamente os níveis de H_2O_2 e, assim, a planta ganha energia necessária para a formação de compostos relacionados a outras adaptações ao alagamento e, ainda, economiza nutrientes, cujos níveis ou disponibilidade, geralmente, são reduzidos em plantas que são submetidas a este tipo de estresse (Kozlowski, 1997).

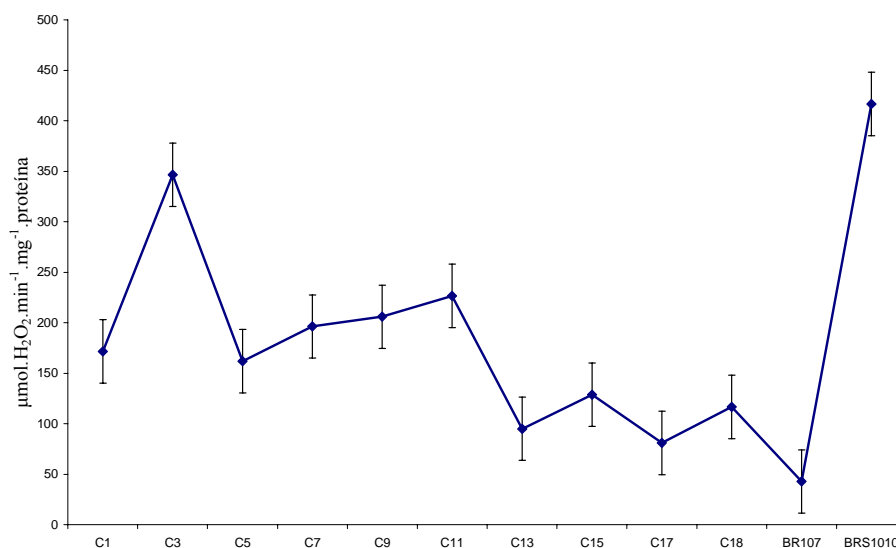


Figura 3. Resultado da análise das atividades da enzima catalase na raiz de plantas em diferentes ciclos de seleção do Milho Saracura submetidas ao alagamento. As barras indicam o erro padrão.

Para a enzima peroxidase, houve um evidente aumento nas atividades ao longo dos ciclos de seleção e os últimos ciclos exibiram maiores valores em relação aos primeiros (Figura 4).

A retirada de CO_2 do substrato pode representar uma importante estratégia adaptativa por auxiliar na manutenção do pH do substrato alagado em valores menos ácidos.

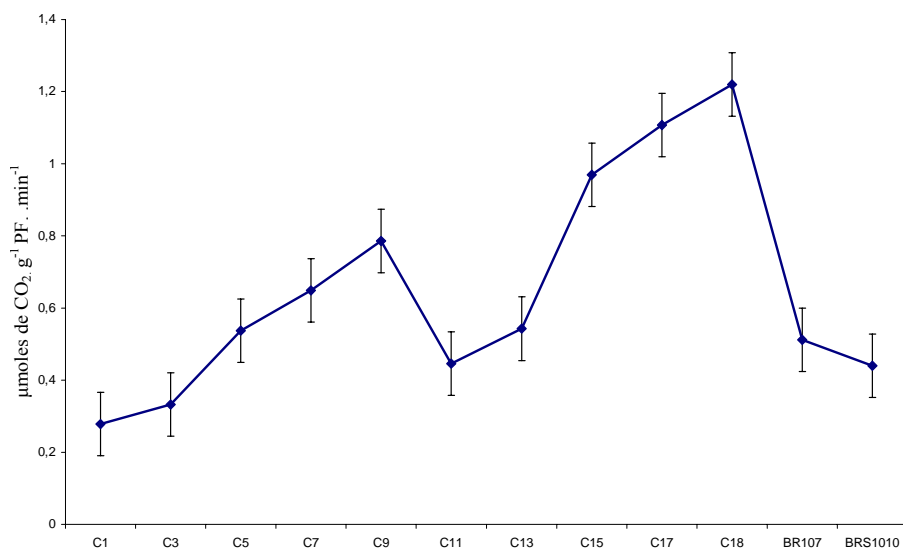


Figura 4. Resultado da análise das atividades da enzima PEPCASE na raiz de plantas em diferentes ciclos de seleção do Milho Saracura submetidas ao alagamento, estresse severo. As barras indicam o erro padrão.

5.6 Conclusões

Os sucessivos ciclos de seleção foram capazes de alterar a atividade das enzimas radiculares, relacionadas ao estresse oxidativo. O aumento das peroxidases do guaiacol e ascorbato, em detrimento das atividades da catalase, pode demonstrar um investimento da planta em eficiência das enzimas e, assim, uma redução no gasto energético para a sua manutenção.

5.7 Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado (F. J. Pereira). À Embrapa Milho e Sorgo, pelo financiamento do projeto.

5.8 Referências bibliográficas

ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; GOULART, P. F. P.; DANTAS, B. F.; GOUVÊA, J. A.; PURCINO, R. P.; MAGALHÃES, P. C.; FRIES, D. D.; LIVRAMENTO, D. E.; MEYER, L. E.; SEIFFERT, M.; SILVEIRA, T. Mecanismos de tolerância da variedade de milho “Saracura” (BRS 4154) ao encharcamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete lagoas, v. 1, n. 1, p. 33-40, jan./abr. 2002.

ANDRADE, A. C. S.; RAMOS, F. N.; SOUZA, A. F.; LOUREIRO, M. B.; BASTOS, R. Flooding effects in seedlings of *Cytherexylum myrianthum* Cham. and *Genipa americana* L.: responses of two neotropical lowland tree species. **Revista brasileira de Botanica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 281-285. Aug. 1999.

BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, Clare, v. 164, n. 1, p. 77-84, Jan. 2003.

DEW, M. C.; Oxigen deficiency and root metabolism: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 223-250, June 1997.

FERRER, J. L. R.; CASTRO, E. M.; ALVES, J. D.; ALEANCAR, M. A.; SILVA, S.; VIEIRA, C. V.; MAGALHÃES, P. C. 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, maio/ago. 2004.

FERRER, J. L. R.; MAGALHÃES, P. C.; ALVES, J. D.; VASCONCELOS, C. A.; DELÚ FILHO, N.; FRIES, D. D.; MAGALHÃES, M. M.; PURCINO, A. A. C. Calcium relieves the deleterious effects of hypoxia on a maize cultivar selected for waterlogging tolerance. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, n. 3, p. 381-389, set./dez. 2005.

FOYER, C. H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J. F.; SCOTT, I. M. Hydrogen peroxide-and glutathione associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signalling, **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v. 100, n. 2, p. 241-254, June 1997.

- KOZLOWSKI, T. T. Plant Responses to Flooding of Soil, **BioScience**, Washington, v. 34, n. 3, p. 162-167, Jan. 1984.
- KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology Monograph**, Victoria, v.1, n.1, p.1-29, June 1997.
- LIAO, C.T.; LIN C. H. Physiological Adaptation of Crop Plants to Flooding Stress. **Proceedings of National Science Council**, Beijing, v. 25, n. 3, p. 148-157, Apr. 2001.
- MADHUSUDHAN, R.; ISHIKAWA, T.; SAWA, Y.; SHIGEOKA S.; SHIBATA, H. Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 117, n. 4, p. 550–557, Apr. 2003.
- MELO, H. C.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.; MELO, L. A.; ALVES, J. D. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 145-153, jun. 2007.
- MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, n. 1, p. 459–481, June 2007.
- NAKANO, Y.; ASSADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, Aug. 1981.
- VITORINO, P. G.; ALVES, J. D.; MAGALHÃES, P. C.; MAGALHÃES, M. M.; LIMA, L. C. O.; OLIVEIRA, L. E. M. Flooding tolerance and cell wall alterations in maize mesocotyl during hypoxia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 8, p. 1027-1035, ago. 2001.

6 CAPÍTULO 4:

Metabolismo do carbono nas raízes de milho (*Zea mays* L.) cultivar Saracura BR-4154 de sucessivos ciclos de seleção sob diferentes regimes de alagamento

(preparado segundo as normas da revista Acta Botânica Brasilica)

Fabricio José Pereira¹²¹³, Evaristo Mauro de Castro¹, Paulo César Magalhães¹⁴,
Thiago Corrêa de Souza¹

¹² Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Campus Universitário, Lavras-MG, caixa postal 37, CEP 37200-000.

¹³ Autor para correspondência: fjprock@hotmail.com

¹⁴ Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, Caixa postal -151, CEP 37701-970.

6.1 Resumo

O alagamento do solo é um fator ambiental que pode trazer grandes prejuízos para a agricultura. A cultura do milho é uma das mais sensíveis a este fator e a variedade Saracura veio para viabilizar seu cultivo nessas condições. Este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar fatores do metabolismo do carbono nas raízes do milho Saracura de amostras intercaladas de 18 sucessivos ciclos de seleção, submetidos ao alagamento intermitente. Os fatores analisados foram: atividade das isoformas da invertase, teores de açúcares redutores e de açúcares solúveis totais. A atividade das invertases foi alterada, havendo um favorecimento da invertase neutra do citosol em relação às ácidas, ligada, provavelmente, à translocação da sacarose simplasticamente e a sua utilização citosólica, compensando a redução do número de células radiculares pela formação de aerênquima. Os teores de açúcares redutores foram aumentados ao longo dos ciclos, promovendo melhorias para as plantas, por compensar a menor produção de ATP com mais substrato para o metabolismo energético. Os teores de açúcares solúveis totais não sofreram alterações ao longo dos ciclos, demonstrando pouca influência deste fator na adaptabilidade.

Palavras chave: alagamento, milho Saracura, açúcares redutores, açúcares solúveis totais, invertases.

6.2 Abstract – Carbon metabolism in the saracura maize (*Zea mays* L.) BR-4154 roots cultivar by successive selection cycles under different flooding conditions

Flooding is an environment factor that could cause problems to agriculture decreasing crop parameters and yield. Maize is a flood-sensitive crop so, the saracura maize cultivar comes like a tolerant possible the maize yield under this stress. The objective of this work was to evaluate the effects of transient flooding in the carbon metabolism of samples of 18 successive selection cycles of saracura maize. The parameters evaluated were: invertases isoforms activities, the contents of reducing sugars and total soluble sugars. The invertases activity were modified along the successive selection cycles, and the cytosolic neutral invertase was increased against the acid invertases. The contents of the reducing sugars increased developing improvements along the cycles, compensating the low ATP production with the more substrate to the energetic metabolism. The total soluble sugars level was not modified along the successive cycles showing that this parameter has few influence to the plants adaptations to flooding.

Key words: flooding, saracura maize, reducing sugars, total soluble sugars, invertases.

6.3 Introdução

Diferentes fatores ambientais podem influenciar as culturas de diferentes formas, podendo levar a problemas com a produção. Entre esses fatores ambientais encontra-se o alagamento, que pode aparecer em várias áreas de potencial agrícola, gerando prejuízos e limitações para as culturas agrícolas ou florestais. Estes ambientes podem se formar naturalmente ou, ainda, se formar por fatores antrópicos; no Brasil, este ocorre em cerca de 28 milhões de hectares (Vitorino et al., 2001). A principal limitação causada por este tipo de estresse é a redução nas taxas de oxigênio, levando a um ambiente de hipoxia ou, mesmo, anoxia. A planta pode, inclusive, responder ao estresse com a expressão de proteínas específicas de estresse anaeróbio denominadas ANPs (Andrade et al., 1999; Kozłowski, 1997; Liao & Lin, 2001).

Dentre as diferentes culturas de importância econômica, o milho ocupa posição de destaque como alimento e matéria-prima. É uma espécie sensível ao alagamento por ser pouco resistente à anoxia, dificultando a sua produção em áreas sujeitas a este fator. Visando ao aproveitamento dessas áreas para a produção do milho, a Embrapa Milho Sorgo desenvolveu e lançou no mercado a variedade Saracura BRS-4154, que tem características adaptativas a este ambiente, possibilitando maior produção de milho nestas áreas e maior sobrevivência (Alves et al., 2002; Ferrer et al., 2004; Melo et al., 2004).

Com a redução dos níveis de oxigênio ocorre a diminuição da atividade da cadeia de transporte de elétrons, dificultando a respiração. O metabolismo das plantas é, então, deslocado para a anaerobiose e ocorre uma diminuição da produção de ATP e alterações que levam a uma redução do crescimento e a

adaptações da planta para compensar a redução na disponibilidade de energia (Kozlowski, 1984; Dew, 1997).

Com a redução do ATP, a planta pode exibir diferenças na forma como os carboidratos são translocados na raiz e nos níveis de carboidratos presentes nos tecidos radiculares destinados a serem metabolizados como substrato da respiração ou do metabolismo anaeróbico. Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar como o estresse por alagamento e sucessivos ciclos de seleção genética podem ter afetado os níveis de carboidratos e das invertases na raiz.

6.4 Material e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, nas áreas experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. O milho Saracura está, atualmente, no 18º ciclo anual de seleção, no qual é submetido ao alagamento intermitente e as plantas com melhores resultados são selecionadas. Neste experimento foram codificados como C1 a C18, em que a letra C representa o ciclo e o número, o ciclo que a sigla representa.

Foi utilizado solo de várzea, adubado e colocado em vasos com capacidade de 20 kg. Os ciclos escolhidos foram C1, C3, C5, C7, C9, C11, C13, C15, C17 e C18, além do genótipo BR 107, sensível ao alagamento e o híbrido BRS 1010, como testemunhas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, perfazendo um total 48 de vasos. Foram semeadas seis sementes por vaso no plantio, desbastando mais tarde para duas plantas.

O início do encharcamento no solo dos vasos foi no estágio de seis folhas completamente desenvolvidas, quando o ponto de crescimento das plantas se encontrava acima do nível da superfície do solo. A adubação em cobertura foi

realizada na dosagem de 100 kg ha⁻¹ de N, divididos em 10 aplicações semanais de 10 kg ha⁻¹ de N (Magalhães et al., 2001). As plantas foram submetidas ao alagamento em intervalos intermitentes de 2 dias, em que os vasos eram completamente encharcados e deixados sem nova adição de água até a próxima aplicação. A coleta das amostras para anatomia ocorreu em um período de 2 meses em relação à primeira aplicação do alagamento nas amostras.

A coleta das raízes para a extração enzimática ocorreu em uma planta por vaso da casa de vegetação, totalizando quatro plantas por tratamento. As plantas foram removidas dos vasos, as raízes lavadas em água corrente até a completa remoção do solo e uma amostra de cerca de 3g de raízes foram imediatamente cortadas envolvidas em papel alumínio e mergulhadas em nitrogênio líquido. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em freezer, a -86°C, até a data das análises enzimáticas.

O extrato enzimático foi realizado com 0,9 mL de um tampão de extração composto de: 883,8 µL de tampão HEPES 0,1M pH 7,5, 9 µL de EDTA 0,1M, 3,6 µL de DTT 0,5M, 7,2 µL de PMSF 0,1M e, ainda, 18 mg de PVPP (Zheng et al., 1999; Ferrer et al., 2005 adaptado). Foram utilizados 0,3 g das raízes, maceradas em nitrogênio líquido e centrifugadas a 14.000 RPM, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante contendo as enzimas foi coletado para a análise da invertase neutra do citosol (INC) e a invertase ácida do vacúolo (IAV). O pellet foi ressuscitado com tampão citrato 0,1 M pH 4,8, para a extração da invertase ácida de parede (IAV) (Zheng et al., 1999; Ferrer et al., 2005 adaptado). Todo o processo de extração foi realizado a 4°C e as amostras foram preservadas no congelador, ao longo das análises.

A atividade da invertase neutra do citosol (INC) foi realizada incubando-se o extrato enzimático em 1 mL de tampão fosfato 0,1M pH 7,5 e as invertases ácidas da parede (IAP) e do vacúolo (IAV) foram incubadas em tampão citrato 0,2M pH 4,8. Ambos os meios de incubação continham, ainda, 5 mM de MgCl₂

e 200 mM de sacarose. Os meios de incubação foram mantidos por 40 minutos em banho-maria, a 30°C e paralisados em nitrogênio líquido em dois momentos: imediatamente após a adição da enzima (T_0) para a determinação dos açúcares redutores endógenos e após 40 minutos de incubação (T_{40}). Depois da incubação, foram adicionados 0,2 mL das amostras, sendo quantificados os açúcares redutores segundo Miller (1959). Para a remoção dos açúcares redutores endógenos foram subtraídos os valores de (T_{40})- (T_0).

O teor de açúcares redutores foi determinado segundo Miller (1959), pela homogeneização de 0,1 g de tecidos radiculares macerados em 2 mL de água destilada e centrifugados a 20.000 g, por 20 minutos. Foram utilizados 0,2 mL do extrato radicular, 0,55 mL de água destilada e 0,5 mL de DNS, aquecidos a 100°C, em banho-maria por 5 minutos, o volume completado para 5 mL com água destilada e a absorbância lida em espectrofotômetro a $\lambda= 540$ nm.

Os açúcares solúveis totais foram determinados segundo Yemm e Willis (1954) pela homogeneização de 0,1 g de tecidos radiculares macerados em 2 mL de água destilada e centrifugados a 20.000 g, por 20 minutos. Os tubos preparados a 4°C foram preparados com 0,1 mL de extrato radicular, 0,9 mL de água destilada e 2 mL de reagente de antrona. Os meios de reação foram aquecidos, por 3 minutos, a 100°C, deixados para esfriar e lidos no espectrofotômetro a $\lambda= 620$ nm.

Os dados foram testados, quanto à normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk e, quanto à homocedacidade, pelo teste de Lavene, sendo todos com distribuição normal e variâncias homogêneas. Foi realizada análise de variância com o teste de F, para detectar as diferenças entre os tratamentos e o teste de Tukey e Skott-Knott, a 5%, para a separação das diferentes médias.

6.5 Resultados e discussão

A atividade as invertases foi alterada significativamente ao longo dos ciclos de seleção do milho Saracura. Sob alagamento severo, os valores da INC exibiram aumento da atividade em relação aos grupos controle e aos ciclos iniciais (Figura 1). O aumento da atividade desta enzima parece ser um fator importante para as plantas sob alagamento, pois, com a adição de cálcio, a atividade desta enzima também foi aumentada no milho Saracura nessas condições (Ferrer et al., 2005). Os ciclos de seleção foram um eficiente mecanismo para favorecer esta enzima, visto que os valores observados nos últimos ciclos, neste trabalho, foram semelhantes aos observados, sob a adição de cálcio (300 a 1500 kg de cálcio por ha), por Ferrer et al., (2005).

Sob estresse severo, houve redução das IAV e IAP dessas enzimas ao longo dos ciclos (Figura 1) e a invertase mais ativa foi a do citosol. Estes resultados são diferentes dos observados por Ferrer et al., (2005), segundo os quais as invertases mais ativas foram as ácidas e os picos de atividade aconteceram na invertase ácida vacuolar.

Este comportamento favorece a conversão da sacarose que entra no citosol em frutose e glicose, em detrimento da conversão apoplástica promovida pela invertase ácida de parede. Este pode ser um fato relacionado a um possível aumento na proporção de aerênquima, que diminui o número de células e, conseqüentemente, o espaço intercelular que liga uma célula diretamente à outra. Dessa forma, a sacarose deve seguir do cilindro vascular para as células do córtex e, mesmo, para a epiderme por difusão e a grande conversão de sacarose em hexoses deverá ocorrer no citosol. Todo processo demonstra mais um comportamento adaptativo das plantas, pois houve um controle na expressão de enzimas relacionadas à quebra da sacarose que se adequavam às modificações morfológicas, demonstrando que as adaptações anatômicas foram paralelas às bioquímicas, para preservar a fisiologia celular. Este fato pode ainda proteger as hexoses, pois, no apoplasto de raízes sob alagamento, podem ocorrer muitos

compostos nocivos, como toxinas e espécies reativas de oxigênio, que podem degradar a frutose ou a sacarose presentes no apoplasto e, assim, preservar substratos respiratórios. Todas as adaptações, portanto, parecem ser favoráveis ao desenvolvimento das plantas de milho Saracura sob estresse por alagamento.

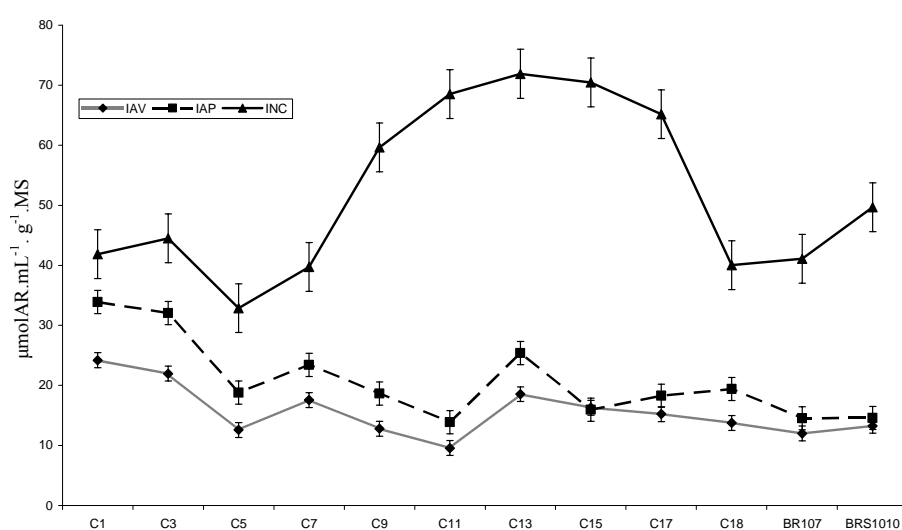


Figura 1. Resultado da análise das atividades das enzimas: invertase ácida vacuolar (IAV) e invertase ácida da parede (IAP), invertase neutra do citosol (INC) na raiz de plantas em diferentes ciclos de seleção do Milho Saracura submetidas ao alagamento. As barras indicam o erro padrão.

Os teores de açúcares redutores foram modificados ao longo dos ciclos de seleção e aumentados em relação ao BR 107, que é uma variedade padrão de sensibilidade ao encharcamento do solo (Figura 2). Dessa forma, em plantas sob estresse, parece haver maior concentração de açúcares redutores, que podem estar sendo acumulados nas raízes ou, mesmo, estar sendo translocados em maior quantidade para servir de substrato respiratório. Isso porque se o metabolismo for deslocado para a anaerobiose, a glicose será aproveitada até a

formação do piruvato (Taiz & Zeiger, 2004) que, depois, será transformado em etanol, sem geração de ATP. Dessa forma, a glicose, como substrato para o metabolismo energético, é subaproveitada e as plantas de milho Saracura foram capazes, portanto, de acumular mais açúcares redutores (Frutose e glicose) que suprem a necessidade das células radiculares de mais substrato para que mais energia por anaerobiose seja produzida. Estas adaptações auxiliam na manutenção do crescimento radicular e permitem que as plantas de milho Saracura sejam mais aptas a sobreviver e produzir durante o período de alagamento, demonstrando claro ganho genético em adaptabilidade dos ciclos em relação ao BR 107.

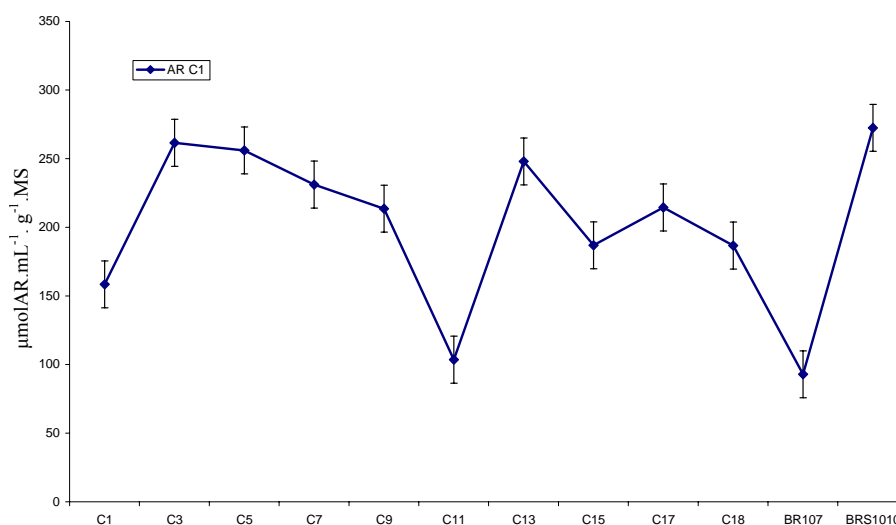


Figura 2. Resultado da análise do teor de açúcares redutores na raiz de plantas em diferentes ciclos de seleção do Milho Saracura submetidas ao alagamento, estresse severo. As barras indicam o erro padrão.

Os açúcares solúveis totais não demonstraram grandes variações ao longo dos ciclos de seleção em relação às testemunhas (Figura 3). A estabilidade

nestes valores pode estar relacionada aos teores de sacarose e de AR presentes no meio celular. Com o consumo dos AR, que é aumentado devido ao subaproveitamento da glicose para a produção de energia, quando ocorre a deficiência de oxigênio (Kozłowski, 1997). Assim, este consumo pode ser compensado por um maior fluxo de sacarose que chega nestes tecidos e os níveis se mantêm nos mesmos níveis.

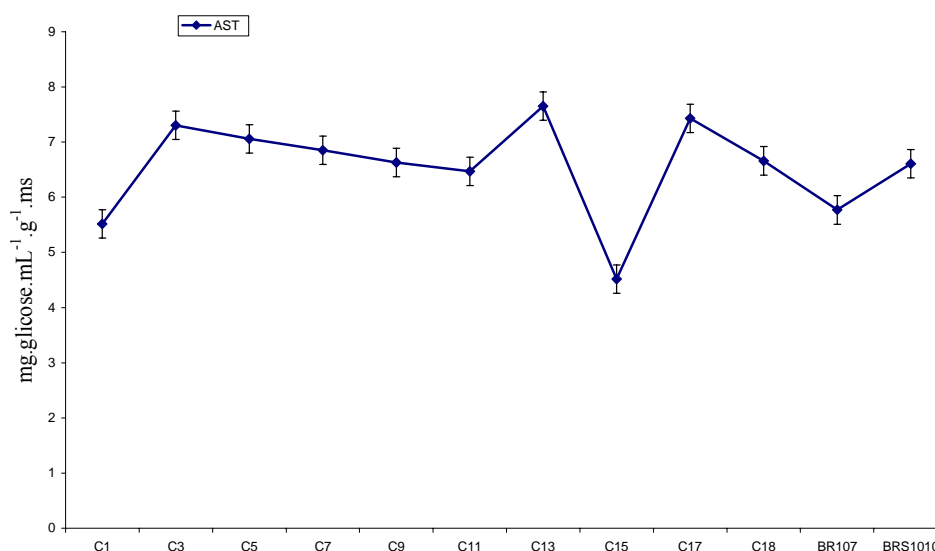


Figura 3. Resultado da análise do teor de açúcares solúveis totais (AST) na raiz de plantas em diferentes ciclos de seleção do Milho Saracura submetidas ao alagamento, estresse severo. As barras indicam o erro padrão.

6.6 Conclusões

Os diferentes ciclos de seleção do milho saracura modificaram a capacidade adaptativa desta variedade, alterando a atividade da INC em detrimento das outras isoformas da invertase, aumentando os teores de açúcares redutores das plantas de milho. Os teores de açúcares solúveis totais não

sofreram alteração, e parecem não influenciar, de forma direta, a adaptabilidade dessas plantas sob o estresse analisado.

6.7 Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado (F. J. Pereira). À Embrapa Milho e Sorgo, pelo financiamento do projeto.

6.8 Referências bibliográficas

ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; GOULART, P. F. P.; DANTAS, B. F.; GOUVÊA, J. A.; PURCINO, R. P.; MAGALHÃES, P. C.; FRIES, D. D.; LIVRAMENTO, D. E.; MEYER, L. E.; SEIFFERT, M.; SILVEIRA, T. Mecanismos de tolerância da variedade de milho “Saracura” (BRS 4154) ao encharcamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n.1, p. 33-40, jan. 2002.

ANDRADE, A. C. S.; RAMOS, F. N.; SOUZA, A. F.; LOUREIRO, M. B.; BASTOS, R. Flooding effects in seedlings of *Cyatharexylum myrianthum* Cham. and *Genipa americana* L.: responses of two neotropical lowland tree species. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 281-285, ago. 1999.

DEW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 223-250, June 1997.

FERRER, J. L. R.; MAGALHÃES, P. C.; ALVES, J. D.; VASCONCELOS, C. A.; DELÚ FILHO, N.; FRIES, D. D.; MAGALHÃES, M. M.; PURCINO, A. A. C. Calcium relieves the deleterious effects of hypoxia on a maize cultivar selected for waterlogging tolerance. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, n. 3, p. 381-389, Jan./Abr. 2005.

FERRER, J. L. R.; MAGALHÃES, P. C.; ALVES, J. D.; VASCONCELOS, C. A.; DELÚ FILHO, N.; FRIES, D. D.; MAGALHÃES, M. M.; PURCINO, A. A. C. Calcium relieves the deleterious effects of hypoxia on a maize cultivar

selected for waterlogging tolerance. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.4, n.3, p.381-389, jan./abr. 2005.

KOZLOWSKI, T. T. Plant Responses to Flooding of Soil. **BioScience**, Washington, v. 34, n. 3, p. 162-167, Jan. 1984.

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

LIAO, C. T.; LIN C. H. Physiological Adaptation of Crop Plants to Flooding Stress. **Proceedings of National Science Council**, Beijing, v. 25, n. 3, p. 148-157, Apr. 2001.

MELO, H. C.; CASTRO, E. M.; ROMERO, J. L.; ALVES, J. D.; FRIES, D. D.; MELO, L. A.; MAGALHÃES, P. C. Influência da aplicação de cálcio e alagamento do solo sobre as 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, set./dez. 2004.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 672 p.

VITORINO, P. G.; ALVES, J. D.; MAGALHÃES, P. C.; MAGALHÃES, M. M.; LIMA, L. C. O.; OLIVEIRA, L. E. M. Flooding tolerance and cell wall alterations in maize mesocotyl during hypoxia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 8, p. 1027-1035, ago. 2001.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemistry Journal**, London, v. 57, n. 5, p. 508-514, Jan. 1954.

ZHENG, Y.; WU, Y.; AVIGNE, W. T.; KOCH, K. E. Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 121, n. 2, p. 599-608, Oct. 1999.