



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

ISSN 1217-1981

Dezembro, 2009

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 13

Atividade de Enzimas do Sistema Antioxidante e as Modificações no Desenvolvimento de Aerênquimas em Raízes de Milho Sob Alagamento

*Paulo César Magalhães
Thiago C. de Souza
Fabrício J. Pereira
Evaristo M. de Castro
Sidney N. Parentoni*

Sete Lagoas, MG
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Caixa Postal 151

Fone: (31) 3027 1100

Fax: (31) 3027 1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Álvaro Corsetti Purcino

Secretário-Executivo: Flávia Cristina dos Santos

Membros: Elena Charlotte Landau, Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes,
Paulo Afonso Viana e Clenio Araujo

Revisor de texto: Clenio Araujo

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Editoração eletrônica: Communique Comunicação

1ª edição

1ª impressão (2009): 200 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo

Atividade de enzimas do sistema antioxidante e as modificações no desenvolvimento de aerênquimas em raízes de milho sob alagamento / Paulo César Magalhães ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2009.

21 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1217-1981; 13).

1. Milho. 2. Zea mays. 3. Raiz. 4. Água no solo. I. Magalhães, Paulo César. II. Série.

CDD 633.15 (21. ed.)

Sumário

Resumo.....	5
Introdução	6
Material e métodos	8
Resultados	11
Discussão	14
Conclusões	17
Referências.....	18

Atividade de Enzimas do Sistema Antioxidante e as Modificações no Desenvolvimento de Aerênquimas em Raízes de Milho Sob Alagamento

Paulo César Magalhães¹

Thiago C. de Souza²

Fabricao J. Pereira²

Evaristo M. de Castro³

Sidney N. Parentoni¹

Resumo

O alagamento pode ser um fator ambiental com possibilidade de causar prejuízos à produção agrícola. Com base nesse contexto, a Embrapa Milho e Sorgo lançou no mercado, após nove anos de seleção, a variedade de milho Saracura - BRS 4154, tolerante ao encharcamento do solo. Esses ciclos de seleção continuam sendo efetuados em campo e hoje se encontram na 18ª edição. No entanto, não existem estudos que comparam todos esses ciclos quanto à atividade enzimática relacionada ao estresse por alagamento. Este trabalho teve como o objetivo mostrar possíveis relações entre atividade de enzimas do sistema antioxidante e a evolução da formação de aerênquimas em raízes de milho Saracura – BRS 4154 alagado.

As cariopses do primeiro ao último ciclo, intercaladas, foram plantadas em

¹ Pesquisadores Embrapa Milho e Sorgo. Caixa postal 151, 35701.970 - Sete Lagoas, MG, pcesar@cnpmis.embrapa.br

²Doutorandos em Fisiologia Vegetal, UFLA, Lavras, MG - Departamento de Biologia

³Professor Anatomia Vegetal, UFLA, Lavras, MG - Departamento de Biologia

vasos preenchidos com solo em casa de vegetação e submetidas ao alagamento intermitente de dois dias. As amostras de raízes foram coletadas e foram analisadas as atividades das enzimas peroxidase do guaiacol, peroxidase do ascorbato e catalase; e a formação de aerênquima foi avaliada por secções anatômicas em microscopia de luz. As plantas demonstraram modificações na atividade das enzimas ao longo dos ciclos, com o favorecimento da peroxidase do ascorbato em detrimento da catalase, redução na atividade da peroxidase do guaiacol e capacidade para o desenvolvimento de aerênquima nos últimos ciclos de seleção. A redução na atividade das enzimas do sistema antioxidante parece estar relacionada a um desbalanço na remoção de H₂O₂ e isso com a formação de aerênquima lisígino nas raízes de milho Saracura.

Introdução

No Brasil, aproximadamente 28 milhões de hectares de áreas com potencial agrícola estão sob regime de inundação intermitente (ANDRADE et al., 1999). Nessas condições, a água ocupa os espaços antes preenchidos pelo ar, gerando uma situação de hipoxia (deficiência de O₂), que pode chegar à anoxia (ausência de O₂) em algumas regiões do solo em razão da respiração dos órgãos submersos de plantas ou dos microrganismos ali existentes (KOZLOWSKI, 1997).

O manejo do solo, inclusive para atividades como a pecuária, pode afetar grandemente a disponibilidade de nutrientes (TRAVIESSO-BELLO et al., 2005) e matéria orgânica do solo hidromórfico, que está presente em ambientes sujeitos ao alagamento. Em qualquer dessas situações, o crescimento, a sobrevivência e conseqüentemente a produção das culturas podem ser severamente reduzidas.

O insucesso do desenvolvimento da cultura do milho em solos com períodos intermitentes de excesso de água está relacionado à alta

sensibilidade dessa cultura a esses ambientes (PEREIRA et al., 2008). Essas características levaram pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, a lançarem no mercado, em 1997, a variedade Saracura - BRS 4154. Após vários ciclos de seleção massal sob condições de alta umidade do solo, a variedade foi identificada como uma das mais adequadas para o cultivo em áreas sujeitas ao encharcamento (ALVES et al., 2002).

Apesar do solo com deficiência de oxigênio ser hostil à vida das plantas, o milho Saracura parece ter desenvolvido, após sucessivos ciclos de seleção genética, mecanismos que permitiram suas sobrevivência e produção nessas condições. Dentre as características que permitem ao milho Saracura tolerar baixa concentração de oxigênio no ambiente radicular, encontram-se aquelas de naturezas metabólica e molecular, incluindo aí o desvio da respiração aeróbica para a via anaeróbica mediante a indução da síntese de polipeptídios típicos da anaerobiose.

Nos últimos oito anos, tem-se dado especial atenção aos danos celulares oxidativos em suas raízes, causados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) sob condições em que a fosforilação oxidativa é reduzida devido à deficiência de O₂. Em plantas, está bem caracterizado que, sob condições de déficit de oxigênio no solo, ocorre um aumento descontrolado de radicais livres nas células (BLOKHINA et al., 2003). Modificações na estrutura e nas funções das membranas, resultantes da peroxidação de seus lipídeos, são bem caracterizadas (CAKMAK; HORST, 1991), podendo produzir danos ao funcionamento e à estrutura celular (MITTLER et al., 2004). No caso particular, o milho Saracura, ao mesmo tempo em que ativa mecanismos para a produção de energia, desenvolve formas de escapar dos danos causados pelos radicais livres, como ativação do sistema antioxidante enzimático e síntese de antioxidantes de baixo peso molecular (LIAO; LIN, 2001).

No nível morfológico, tem-se como uma das principais adaptações a formação de aerênquimas que se inicia na região central do córtex para,

posteriormente, se espalhar de forma radial e tangencial (BOURANIS et al., 2006). O desenvolvimento do aerênquima leva à formação de espaços intercelulares, conectados ao longo do eixo da raiz, que facilitam a difusão de gases (GUNAWARDENA, 2008) e, conseqüentemente, permitem melhor distribuição do O₂ nos tecidos das plantas. Essa estrutura pode estar presente em folhas, pecíolos, caules e raízes, podendo surgir por separação das células (esquizogenia) ou por lise de células (lisigenia) (SCHUSSLER; LONGSTRETH, 1996), de maneira constitutiva ou em resposta a um estímulo ambiental. Em raízes e coleótilos de plântulas de milho Saracura, a hipoxia induziu o desenvolvimento de grandes espaços intercelulares, formando aerênquima predominantemente lisígeno, em resposta ao aumento da atividade da celulase nessa condição (VITORINO et al., 2001).

Uma vez que o déficit de oxigênio leva à produção de EROs e esse, por sua vez, promove a morte celular, é possível que exista relação entre o acúmulo de radicais livres e o desenvolvimento de aerênquima com origem lisígena. Em função da ausência de pesquisas no assunto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de mostrar possíveis relações entre atividade de enzimas do sistema antioxidante e a evolução da formação de aerênquimas em raízes de milho Saracura - BRS 4154 alagado.

Materiais e métodos

Seis cariopses do milho Saracura - BRS 4154 tolerante às condições de encharcamento intermitente do solo, colhidas em lavouras dos ciclos de seleção (C) 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 18, e da cultivar BR 107, classificada como sensível (ALVES et al., 2002), foram semeadas em vasos contendo 20 L de solo de várzea classificado como Planosolo Hidromórfico Eutrófico Arênico. Cada vaso recebeu a seguinte adubação em cobertura: 0,075 g/kg de sulfato de amônia em duas aplicações semanais; 0,0333 g/kg de uréia em quatro aplicações semanais; 0,3 g/kg

de Zn; e 1 mL/kg de deltametrina (FERRER et al., 2005) em três doses semanais. Quinze dias após a semeadura, procedeu-se o desbaste para duas plantas por vaso.

Até o estágio V6, quando as plantas se encontravam com seis folhas completamente desenvolvidas, a água no solo foi mantida próxima à capacidade de campo. A partir daí, iniciou-se o tratamento de encharcamento intermitente do solo com adição de água em excesso (até a altura de 1 cm acima do nível de solo) a cada dois dias. No intervalo, não se adicionava nenhuma quantidade de água, deixando-a drenar livremente até a próxima adição. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com um vaso por parcela, repetido quatro vezes.

Sessenta dias após o início da primeira aplicação dos tratamentos (encharcamento intermitente do solo), foram coletadas amostras de raízes para as análises enzimáticas e de aerênquima. Ao final do período experimental, a parte aérea foi excisada e o sistema radicular foi cuidadosamente lavado com água corrente até a completa remoção do solo. Em seguida, amostras de 5 g de raízes foram coletadas, envolvidas em papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -86 °C até o momento das análises enzimáticas, quando, então, foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino.

Em seguida, a cada amostra foi adicionado 0,9 mL de um tampão de extração constituído 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 (adaptado de BOR et al., 2003). Após homogeneização, o extrato foi clarificado por centrifugação a 14000 RPM durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para ser utilizado nas determinações das atividades das seguintes enzimas: peroxidase do guaiacol (POD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT).

A atividade da peroxidase do guaiacol (POD) 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 em 20 μL do sobrenadante (adaptado de NAKANO; ASADA, 1981). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento do aumento da absorbância a 470 nm por 2 min em intervalos de 15 seg e calculada com base no fator de extinção de 26,6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

A peroxidase do ascorbato (APX) foi analisada 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 em 20 μL do sobrenadante (adaptado de NAKANO; ASADA, 1981). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento da queda da absorbância a 290 nm por 2 min, em intervalos de 15 seg, e calculada com base no fator de extinção de 2,8 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Para a quantificação da atividade da catalase (CAT), adicionou-se a 20 μL sobrenadante 0,98 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7, H_2O_2 0,0125 M (adaptado de MADHUSUDHAN et al., 2003). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento da queda da absorbância a 240 nm por 2 min, em intervalos de 15 seg, e calculada com base no fator de extinção de 36 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Para as análises de aerênquima, foram coletadas aleatoriamente em cada planta cinco raízes contendo as regiões apical, de alongamento, pelífera e basal. Após sucessivas lavagens, as raízes foram fixadas em solução de formaldeído, ácido acético e etanol 70 % (FAA 70) (JOHANSEN, 1940) por 48 h e, em seguida, preservadas em etanol 70 % até a data das análises (GRISI et al., 2008). Fragmentos de raízes cortados a 4+0,5 cm a partir do ápice radicular (MELO et al., 2007) foram utilizados para a realização de cortes transversais realizados em micrótomo de mesa. Os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio a 5 % por 10 min, reidratados por 10 min, corados com astrablue (solução de safranina e azul de astra 7,5:2,5) e montados em lâminas com glicerina 50 % (KRAUS; ARDUIN, 1997). Foi utilizado microscópio óptico acoplado a uma câmera digital, com a qual foram realizadas fotografias dos cortes. Essas foram utilizadas para as

medições dos parâmetros anatômicos pelo programa de análise de imagem Imagetool, calibrado com régua microscópica fotografada nos mesmos aumentos das fotografias (PEREIRA et al., 2008). Foram realizadas quatro medições de cada característica anatômica, em cada repetição, para a determinação das médias. A proporção da área ocupada pelo aerênquima no córtex foi calculada com base na divisão da área total de aerênquima formado pela área total do córtex. Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homocedacidade pelo teste de Lavene, apresentando distribuição normal e variâncias homogêneas. Utilizaram-se a análise de variância e o teste de Tukey, a 5 % de probabilidade, para análise estatística dos resultados.

Resultados

Do ciclo de seleção 1 (C1) para ciclo 18 (C18), observou-se um aumento significativo de 0,27 para 2,03 mm² na área de aerênquima, que ocuparam proporcionalmente, na região do córtex, uma área de 8,7 % no C1 e 49,01 % no C18 (Figura 1). No caso do BR 107, a área de aerênquima foi de 0,07 mm², com área relativa ao córtex de 1,46 %.

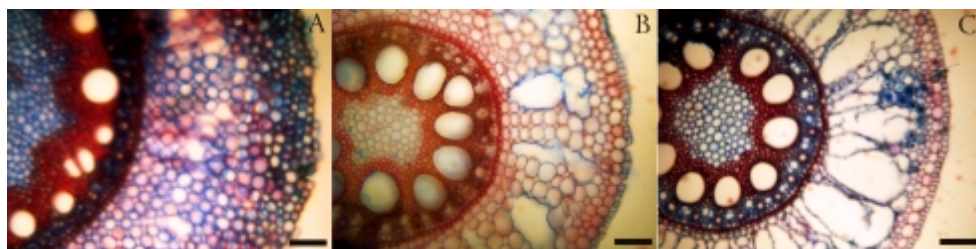


Figura 1. Secções transversais de raízes de milho Saracura de diferentes ciclos de seleção (B e C) e de uma variedade não tolerante BR 107 (A). Ilustram a evolução do desenvolvimento de aerênquima ao longo dos ciclos C1 (B) e C18 (C), em comparação à variedade não tolerante BR 107. barras= 200 μ m

Neste trabalho, foram investigadas também as enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (POD), especializadas na remoção de H₂O₂, um oxidante relativamente estável e que tem sua passagem facilitada pela bicamada lipídica da membrana celular, devido à sua ausência de carga. Além disso, tem sido demonstrado que a síntese dessa molécula é expressivamente ativada pelo alagamento (MOLLER et al., 2007).

Em relação à CAT, verifica-se de maneira geral uma diminuição gradativa na sua atividade no sistema radicular, considerando-se o avanço na seleção do milho Saracura desde o C1 até o C18 (Figura 2). Essa enzima, presente nos peroxissomos, age removendo o H₂O₂, decompondo-o em oxigênio molecular. Alternativamente, o H₂O₂ pode também ser removido pela GPX via ciclo glutathiona reduzida / glutathiona oxidada, com a liberação de água. Nesse caso, observa-se que, nos primeiros ciclos de seleção, a atividade dessa enzima é alta, reduzindo acentuadamente com o progresso da seleção, sendo que no C18 sua atividade é uma das mais baixas (Figura 3).

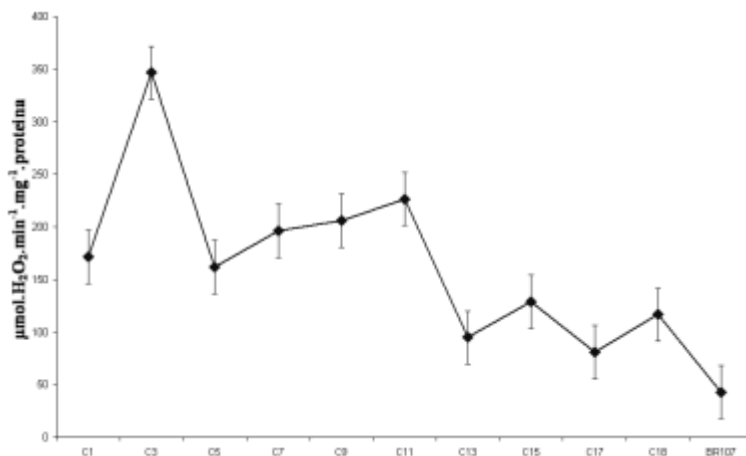


Figura 2. Resultado da análise da atividade da enzima catalase (CAT) na raiz de plantas em diferentes ciclos de seleção do milho Saracura submetidas ao alagamento. As barras indicam o erro padrão a 5 % de significância

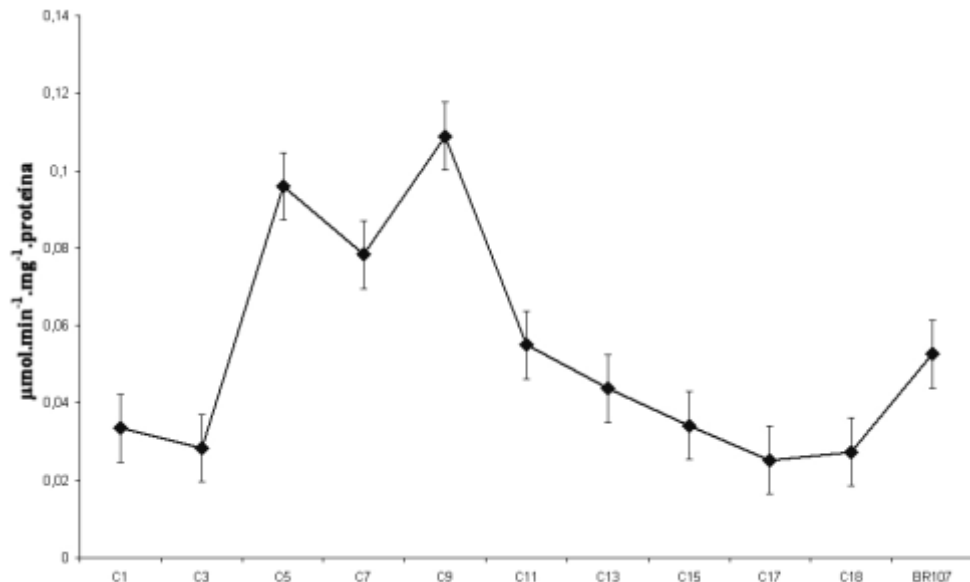


Figura 3. Resultado da análise da atividade da enzima peroxidase do guaiacol (POD) na raiz de plantas em diferentes ciclos de seleção do milho Saracura submetidas ao alagamento. As barras indicam o erro padrão a 5 % de significância

Finalmente, o H₂O₂ pode também ser desintoxicado pela APX que, ao contrário da CAT e POD, teve sua atividade aumentada entre o C1 e o C18 (Figura 4). Essa enzima utiliza o ascorbato como doador específico de elétrons para reduzir o H₂O₂ à água, gerando monodehidroascorbato e esse, por sua vez, é regenerado novamente a ascorbato, mantendo, assim, o sistema antioxidante ativo.

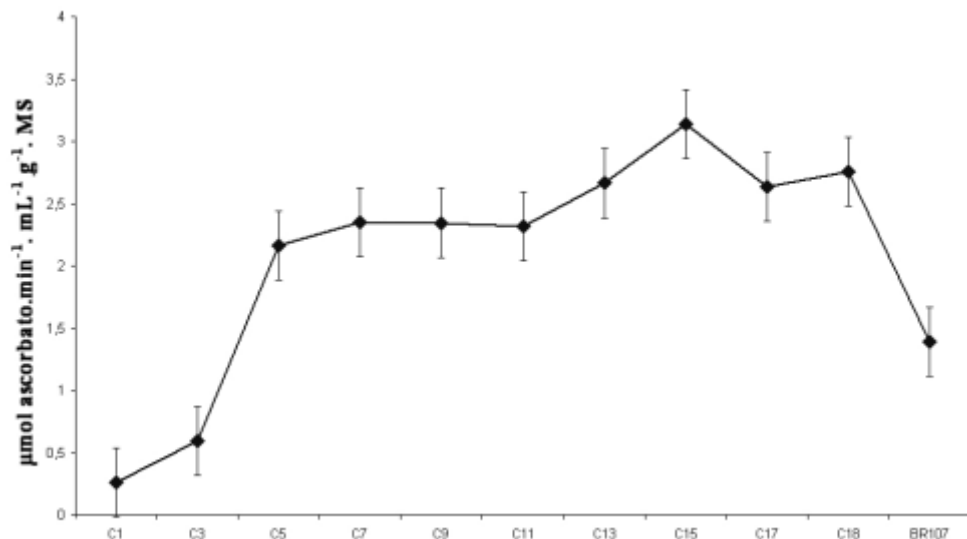


Figura 4. Resultado da análise da atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) na raiz de plantas em diferentes ciclos de seleção do milho Saracura submetidas ao alagamento. As barras indicam o erro padrão a 5 % de significância

Discussão

Durante o processo de seleção do milho Saracura - BRS 4154, foi observado um aumento na tolerância ao encharcamento intermitente do solo ao longo dos ciclos de seleção. Dentre os vários mecanismos de tolerância ao estresse de oxigênio, verifica-se que a formação de aerênquima no córtex da raiz foi observada em plantas mais tolerantes (Figura 1) e houve aumento do aerênquima à medida que os ciclos de seleção progrediram. Isso indica que esse mecanismo de defesa ao estresse foi selecionado sob condições de hipoxia, por conferir melhor

adaptabilidade à planta. O aerênquima permite o aumento da oxigenação interna das raízes (oxigenação dos tecidos), importante para manter o metabolismo aeróbico, ainda que no meio ambiente esteja ocorrendo uma situação de hipoxia ou anoxia. Portanto, essa estratégia permite ao milho Saracura crescer e sobreviver por períodos de tempo maiores que outras cultivares que não apresentam tais estruturas. Os resultados mostram, então, um aumento na tolerância das plantas do C1 para C18 a ambientes encharcados devido a uma melhor difusão de oxigênio pelos tecidos da raiz, o que é de vital importância para o incremento da tolerância das plantas ao alagamento (VITORINO et al., 2001). Quando comparados aos da variedade não tolerante BR 107, os resultados estão de acordo com trabalhos anteriores, que relatam a superioridade do milho Saracura no que se refere a características de tolerância ao alagamento (ALVES et al., 2002; PEREIRA et al., 2008; VITORINO et al., 2001).

Para o milho Saracura e outras espécies de plantas, está amplamente documentado que situações de déficit de oxigênio, como aquelas causadas pelo encharcamento ou alagamento, promovem um estresse oxidativo com acúmulo de EROs. De acordo com BLOKHINA et al. (2003), o acetaldeído, normalmente acumulado sob essa condição de estresse, pode funcionar como doador de elétrons ativando o $O_2^{\cdot-}$ que, ao sofrer dismutação pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), forma H_2O_2 . Os níveis de H_2O_2 , por sua vez, são regulados pela ação da CAT e por diversas peroxidases, entre elas a POD, e pela APX, uma enzima do ciclo ascorbato-glutationa. Por outro lado, está também documentado que, em condições de alagamento, o acúmulo de EROs pode produzir aerênquima, um tecido especializado em armazenamento de oxigênio, produzido pela apoptose celular desencadeada pelo hormônio etileno (DREW, 1997). Partindo dessa observação, verificou-se que, entre os ciclos iniciais e finais de seleção da cultivar Saracura, ocorre uma queda na atividade das enzimas antioxidantes CAT e POD (Figuras 2 e 3). Como essas enzimas, principalmente a CAT, são especializadas na remoção de peróxidos tóxicos das células quando esses estão em altas concentrações

(MITTLER et al., 2004), os resultados sugerem que, quando a atividade dessas enzimas diminui (o que foi verificado em plantas de ciclos de seleção mais adiantados), pode estar havendo certo acúmulo de EROs. Isso sugere que a atividade da APX não foi suficiente para remoção de H₂O₂, mesmo apresentando atividade aumentada a partir do C3 (Figura 4). Sendo essa uma enzima considerada de maior eficiência (MADHUSUDHAN et al., 2003), poderia otimizar o controle do H₂O₂ nas células que permaneceram vivas no córtex e nos demais tecidos radiculares. Segundo Cakmak e Horst (1991), em plantas mantidas sob condições de estresse, a redução na atividade da CAT indica que o H₂O₂ gerado é mais consumido em processos oxidativos, como na peroxidação de lipídios, do que eliminado no metabolismo.

No presente trabalho, é possível que a ação conjunta das três enzimas não tenha sido mantida suficientemente elevada para a manutenção do equilíbrio entre a formação e a remoção do H₂O₂ do ambiente intracelular. Essa condição, presente nos ciclos finais de seleção, ainda que caracterizasse uma condição de um leve estresse oxidativo, foi determinante para a formação de aerênquimas, o que, em última análise, foi benéfico ao conferir tolerância ao estresse.

Além desses efeitos no balanço entre acúmulo e desintoxicação de EROs, sabe-se que as isoenzimas aniônicas da POD são relacionadas à formação de parede celular e à formação de lignina e suberina (FIELDER; GERHARDT, 1998). Portanto, a queda na atividade dessa enzima pode ter levado à redução na síntese de parede celular e de tecidos lignificados nas raízes dos últimos ciclos. Desse modo, é possível que a redução na biossíntese de parede celular possa estar relacionada a maior formação de câmaras de aerênquima nas raízes de plantas selecionadas dos últimos ciclos em relação aos iniciais e a menor produção de tecidos suberizados nas raízes, como a camada de células suberizadas abaixo da epiderme e a endoderme. Esses efeitos morfológicos foram encontrados para os mesmos ciclos de seleção do milho Saracura por Pereira et al. (2008), sugerindo o possível papel das isoformas aniônicas da POD durante a

formação de aerênquima em raízes de milho Saracura.

Conclusões

No presente caso, é possível que a ação conjunta das três enzimas não tenha sido mantida suficientemente elevada para a manutenção do equilíbrio entre a formação e a remoção do H₂O₂ do ambiente intracelular. Essa condição, presente nas plantas selecionadas nos ciclos finais de seleção, ainda que caracterizasse uma condição de um leve estresse oxidativo, foi determinante para a formação de aerênquimas, o que, em última análise, foi benéfico ao conferir tolerância ao estresse.metaxilema (DVM) ao longo dos ciclos de seleção (Figura 2D, 2 E, 2 F). O maior diâmetro de metaxilema foi encontrado na testemunha (66,50), o qual foi estatisticamente semelhante aos dos ciclos 1, 3, 5 e 7. (Tabela 3). O C18, juntamente com os ciclos 9, 11, 13, 15, e 17, resultou no menor diâmetro (Tabela 3). Os ciclos 1 e 3 e a variedade sensível BR 107 apresentaram as maiores distâncias entre os feixes vasculares (DVA) (Tabela 3) e foram semelhantes entre si. Do C5 ao C18, houve uma diminuição nessa distância, sendo que entre ciclos não foram detectadas diferenças. O C18, em relação ao BR 107 e ao C1, apresentou, respectivamente, uma redução de 15,49 % e 12,14 %.

O número de células buliformes (NCB) da testemunha foi estatisticamente semelhante ao dos ciclos 1, 3 e 5. A partir do C7 até o C18, as médias foram iguais e com menores valores. O C18 teve diminuição de 31,4 % em relação à testemunha e de 30 % em relação ao ciclo 1 (Figura 2J, 2K, 2L).

Os diâmetros das células buliformes também diminuíram ao longo dos ciclos de seleção (Tabela 3, Figura 2J, 2K, 2L). A testemunha e os ciclos 1, 3, 7 e 9 foram estatisticamente semelhantes entre si e corresponderam às maiores médias.

Referências

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, p. 33-40, 2002.

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

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

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**, Limerick, v. 164, p. 77-84, 2003.

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**, London, v. 97, p. 695-704, 2006.

BUCKNER, B.; JOHAL, G. S.; JANICK-BUCKNER, D. Cell death in maize. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 108, p. 231-239, 2000.

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

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, p. 251-257, 2001.

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

DREW, M. C.; JACKSON, M. B.; GIFFARD, S. Ethylene: promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptative responses to flooding in *Zea mays* L. **Planta**, Berlin, v. 147, p. 83-88, 1979.

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, p. 172-181, 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. 3, p. 381-389, 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**, Limerick, v. 132, p. 89-99, 1998.

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

GRISI, F. A.; ALVES, J. D.; CASTRO, E. M.; OLIVEIRA, C.; BIAGIOTTI, G.; MELO, L. A. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café 'Catuaí' e 'Siriema' submetidas aos estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 1730-1736, 2008.

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

HE, C. J.; MORGAN, P. W.; DREW, M. C. Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 112, n. 2, p. 463-472, Oct. 1966.

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, p. 162-167, 1984.

KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology Monograph**, v. 1, p. 1-29, 1997. Disponível em: <<http://www.pucrs.br/fabio/fisiovegetal/Encharcamento.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2009.

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 the National Science Council**, Taipei, v. 25, p. 148-157, 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, p. 550-557, 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, p. 145-153, 2007.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, p. 490-498, 2004.

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

MÜHLENBOCK, P.; PLASZCZYCA, M.; PLASZCZYCA, M.; MELLEROWICZ, E.; KARPINSKI, S. Lysigenous aerenchyma formation in Arabidopsis is controlled by lesion simulating disease. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 11, p. 3819-3830, 2007.

NAKANO, Y.; ASSADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 22, p. 867-880, 1981.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 1649-1656, 2008.

SCHUSSLER, E. E.; LONGSTRETH, D. J. Aerenchyma develops by cell lysis in roots and cell separation in leaf petioles in *Sagittaria lancifolia* (Alismaceae). **American Journal of Botany**, Bronx, v. 83, p.1266-1273, 1996.

SHIONO, K.; TAKAHASHI, H.; COLMER, T. D.; NAKAZANO, M. Role of ethylene in acclimations to promote oxygen transport in roots of plants in waterlogged soils. **Plant Science**, Limerick, v. 175, n. 1/2, p. 52-58, 2008

TRAVIESSO-BELLO, A. C.; MORENO-CASASOLA, P.; CAMPOS, A. Efecto de diferentes manejos pecuários sobre el suelo e la vegetacion en humedales transformados em pastizales. **Interciência**, Caracas, v. 30, p. 12-18, 2005.

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, p. 1027-1035, 2001.