



**NÁDIA ALVES CAMPOS**

**EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA À  
FORMAÇÃO DE AERÊNQUIMAS EM RAÍZES  
DE MILHO SARACURA BRS 4154 SOB  
HIPOXIA**

**LAVRAS – MG**

**2010**

**NÁDIA ALVES CAMPOS**

**EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA À FORMAÇÃO DE  
AERÊNQUIMAS EM RAÍZES DE MILHO SARACURA BRS 4154 SOB  
HIPOXIA**

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

Orientador

Dr. José Donizeti Alves

**LAVRAS - MG**

**2010**

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

Campos, Nádia Alves.

Expressão gênica associada à formação de aerênquimas em  
raízes de milho Saracura BRS 4154 sob hipoxia / Nádia Alves  
Campos. – Lavras : UFLA, 2010.

54 p. : il.

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

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. Alagamento. 2. Real Time PCR. 3. EROs. 4. Sistema  
antioxidante. 5. Genética bioquímica. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD – 581.87328

**NÁDIA ALVES CAMPOS**

**EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA À FORMAÇÃO DE  
AERÊNQUIMAS EM RAÍZES DE MILHO SARACURA BRS 4154 SOB  
HIPOXIA**

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

APROVADA em 16 de julho de 2010.

Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Dr. Paulo César Magalhães	EMBRAPA
Dr. Alan Carvalho Andrade	EMBRAPA

Dr. José Donizeti Alves

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2010**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Universidade Federal de Lavras por toda a minha formação profissional e pelas oportunidades.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade de cursar o mestrado e por tudo que me acrescentou.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Setor de Fisiologia Vegetal, onde foi realizada parte dos experimentos, ao Laboratório Central de Biologia Molecular e ao Laboratório de Anatomia.

Ao prof. Dr. José Donizeti Alves, pela orientação, confiança, apoio, amizade e acima de tudo pela humanidade.

Ao meu Co-orientador, Dr. Paulo César Magalhães, pela atenção e auxílio sempre que precisei.

Ao pesquisador Dr. Marcelo Murad pelas dicas, dedicação, apoio e amizade.

Ao prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro e ao Dr. Alan Carvalho Andrade pela disponibilidade em participarem da banca de defesa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pelos conhecimentos transmitidos em aulas teóricas e práticas. Principalmente ao prof. Dr. Luciano Vilela Paiva, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade e pelo esforço em sempre aprimorar a qualidade do nosso curso.

A todos os colegas do LCBM, pela ajuda técnica e principalmente pelo convívio e apoio de sempre.

Aos funcionários do LCBM, Eula e Fabrício, por toda ajuda, disponibilidade, torcida e amizade.

Às grandes amigadas que fiz durante esse tempo, Elizângela, Dani, Glacy, Kátia, Humberto, Felipe, em especial à Cássia, Lu e a todos da turma de

2008/2 por dividirem comigo as mesmas angústias, aflições, grupos de estudos, pela torcida e amizade independente da distância.

Ao Gabriel por todo auxílio que foi fundamental para a conclusão deste trabalho, pela paciência e pela amizade. À Ingrid pela amizade e pelos pequenos gestos que tantas vezes levantaram o meu astral.

A todos os colegas e amigos que fiz na Fisiologia Vegetal. À Kamila, pela amizade, pelos estudos e por todo apoio durante o decorrer deste trabalho.

Às minhas amigas mais que especiais, Brenda e Fabiana pela convivência, torcida, ajuda, paciência, enfim pela amizade.

À Mel, pela amizade de tantos anos, por dividir comigo todos os momentos desde o começo, pela torcida e convivência.

A todos os meus amigos, novos e antigos, por fazerem parte da minha vida e sempre torcerem por mim.

Ao meu namorado Léo, pelo amor e companheirismo, e principalmente pela compreensão nos momentos difíceis.

A todos que tiveram participação direta ou indireta na realização de mais um sonho.

E o meu agradecimento, mais que especial à minha família. Meus pais, por abrirem mão de tanta coisa por mim, por serem meu chão, meu apoio e meus maiores incentivadores. Aos meus irmãos, Laís e Renan, por dividirem a vida comigo.

Todos fazem parte desta conquista!

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os níveis de expressão dos genes APX, XET, CAT e SOD, em plântulas de milho BRS – 4154 (Saracura) em 2 ciclos de seleção e relacioná-los com o início do desenvolvimento de aerênquimas, umas das principais adaptações de plantas em resposta ao alagamento. Para tanto foram realizadas análises anatômicas e a técnica PCR em tempo real. O material vegetal utilizado foram raízes primárias de plântulas de milho germinadas em vermiculita por 4 dias e posteriormente submetidas a diferentes períodos de alagamento, 0, 12 e 24 h. Após esse período foi possível perceber por análises anatômicas o aumento gradativo na proporção de aerênquimas no córtex da raiz com o passar do tempo de alagamento. Esse aumento foi verificado também entre os ciclos onde o ciclo 18 mostrou maior área total do córtex ocupada por aerênquimas que o ciclo 1. Os resultados das análises de expressão gênica nesses dois ciclos mostraram padrão semelhante com alta expressão logo após a germinação, caindo após 12h e voltando a subir após 24 h de alagamento, porém sem chegar ao nível inicial. A necessidade de plasticidade da parede celular para permitir a germinação e o crescimento da plântula justifica a alta expressão do gene XET logo após a germinação. Durante a germinação há uma forte atuação da SOD que libera  $H_2O_2$  que precisa ser removido pela ação da enzima APX. Esse fato explica a baixa expressão do gene SOD e a alta expressão do gene APX logo após a germinação. Com o passar do tempo de alagamento há um acúmulo de EROs propiciando a formação de aerênquimas e funcionando como sinalizadores moleculares aumentando a expressão dos genes das enzimas antioxidantes após 24 h, coincidindo com o início da maior formação de aerênquimas.

Palavras-chave: Alagamento. Real Time PCR. EROs. Sistema antioxidante. Genética bioquímica.

## ABSTRACT

The present research aimed to evaluate the gene expression levels of APX, XET, CAT and SOD in maize BRS 4151(saracura) plantlets in two selection cycles and correlate them with the beginning of aerenchym development, one of the most important plant adaptation to flooding. For this purpose, there were made anatomical analysis and Real Time PCR assay. The plant material used were primary roots from maize plantlets germinated in vermiculite during four days and submitted to different flooding time 0, 12 and 24 hs. After this time it was possible to verify by anatomical analysis the gradative increase in aerenchym rate in root cortex associated with flooding time advance. This increase was also verified between cycles where the cycle 18 showed a total cortex area occupied by aerenchym than the cycle 1. The results of the gene expression in both cycles showed similar pattern like a high expression immediately after germination, decreasing after 12 hs, with another increment after 24 hs, but lower than initial level. The cell wall plasticity necessary during germination and plantlet growth justify the high XET gene expression after this event. During germination the SOD activity liberates  $H_2O_2$  that need to be removed by APX enzyme. This fact explain the low SOD expression gene and high level of APX expression gene after germination. Concomitantly with flooding advance time occur an accumulation causing an aerenchym formation and act as molecular signalizers increasing the gene expression of antioxidant enzymes after 24hs, coinciding with the beginning of the higher aerenchym formation.

Keywords: Flooding. Real Time PCR. EROs. Antioxidant system.  
Biochemical genetics.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	11
<b>2.1</b>	<b>O milho</b> .....	11
<b>2.2</b>	<b>O alagamento e seus efeitos sob as plantas</b> .....	12
<b>2.3</b>	<b>As enzimas do sistema antioxidante e sua relação com tolerância ao alagamento</b> .....	13
<b>2.3.1</b>	<b>Superóxido Dismutase (SOD)</b> .....	15
<b>2.3.2</b>	<b>Catalase (CAT)</b> .....	15
<b>2.3.3</b>	<b>Peroxidase do Ascorbato (APX)</b> .....	16
<b>2.4</b>	<b>A parede celular e o aerênquima</b> .....	16
<b>2.4.1</b>	<b>Xiloglucano Endotransglicosilase (XET)</b> .....	18
<b>2.5</b>	<b>O milho BRS 4154 “Saracura”</b> .....	19
<b>2.6</b>	<b>PCR em tempo real</b> .....	21
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
<b>3.1</b>	<b>Local dos experimentos</b> .....	23
<b>3.2</b>	<b>Material vegetal</b> .....	23
<b>3.3</b>	<b>Germinação e alagamento</b> .....	23
<b>3.4</b>	<b>Anatomia</b> .....	25
<b>3.5</b>	<b>qrtPCR</b> .....	26
<b>3.5.1</b>	<b>Extração de RNA</b> .....	26
<b>3.5.2</b>	<b>Síntese de cDNA</b> .....	27
<b>3.5.3</b>	<b>Desenho de primers e montagem das placas de qrtPCR</b> .....	28
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	31
<b>4.1</b>	<b>Análises anatômicas</b> .....	31
<b>4.2</b>	<b>Expressão de genes das enzimas do sistema antioxidante e de parede celular</b> .....	34
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	41
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

Há grande variedade de ambientes no planeta com regiões de climas distintos e condições de solos diversos, como por exemplo, solos com acúmulo de água. Somente no Brasil, existem aproximadamente 28 milhões de hectares de áreas com potencial agrícola que estão sob regime de inundação intermitente. No entanto, existe uma escassez de espécies vegetais de interesse comercial adaptadas a essas condições de baixa concentração de oxigênio (hipoxia) causadas pelo encharcamento do solo, dentre elas, o milho que é uma planta bastante representativa no agronegócio brasileiro. O insucesso do desenvolvimento da cultura do milho em solos com períodos intermitentes de excesso de água está relacionado às alterações causadas por essa condição e à alta sensibilidade dessa cultura a esses ambientes. Levando em consideração essas características, pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, MG, desenvolveram e lançaram no mercado, em 1997, a variedade Saracura BRS-4154. Após vários ciclos de seleção sob condições de alta umidade do solo, essa variedade revelou-se como uma das mais adequadas para o cultivo em áreas sujeitas ao encharcamento intermitente.

Em plantas, está bem caracterizado que sob condições de déficit de oxigênio no solo, ocorre um aumento acentuado de radicais livres nas células que podem produzir danos ao funcionamento e à estrutura celular. Nessas condições, trabalhos relacionados à atividade de diversas enzimas antioxidativas tais como, peroxidase do ascorbato, catalase e superóxido dismutase no sistema radicular já foram realizados comprovando o envolvimento dessas no mecanismo de tolerância à hipoxia.

Um das principais adaptações que confere resistência às plantas ao alagamento é a formação de aerênquimas. O desenvolvimento dessa estrutura leva à formação de espaços intercelulares, conectados ao longo da raiz, que

facilitam a difusão de gases permitindo melhor distribuição do O<sub>2</sub> nos tecidos das plantas. Uma vez que o déficit de oxigênio induz a produção de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) e esses por sua vez, promovem a morte celular, é possível que exista relação entre o acúmulo de radicais livres e o desenvolvimento de aerênquimas.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão dos genes de enzimas ligadas ao sistema antioxidante e à parede celular no sistema radicular de plântulas de milho Saracura dos ciclos 1 e 18 ao longo do primeiro dia de alagamento e relacioná-las com o início da formação de aerênquimas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O milho

O milho *Zea mays* L. é uma gramínea pertencente à família *Poaceae*. É considerada a espécie botânica com maior diversidade genética existente na natureza, apresentando cerca de 300 raças e contando ainda com grande diversidade de variedades intra-raciais (PATERNIANI, 1993; RANERE et al., 2009). Sua origem é atribuída ao México ou à América Central há cerca de 10 mil anos e sua domesticação se deu a partir de uma espécie de gramínea selvagem chamada Tossinte (DESPRÉS et al., 2003; DOEBLEY, 2004; PANAUD, 2009).

Recentemente, o sequenciamento completo do genoma do milho revelou a existência de 32 mil genes divididos em 10 pares de cromossomos com 23 bilhões de bases químicas de DNA. Cerca de 85% dos segmentos de DNA são elementos de transposição, ou seja, trechos de informações genéticas que podem se destacar de uma região e acoplar-se em outra, gerando novas características nas plantas. Também há vários genes duplicados ou quadruplicados, o que aumenta as chances de surgir uma variação genética benéfica e diminui o impacto de uma mutação prejudicial. Essas descobertas oferecem pistas para a variabilidade tão grande dessa espécie (SCHNABLE et al., 2009).

Esse cereal apresenta uma grande variedade de produtos industrializados por possuir alto valor nutricional e composição química com cerca de 71% de amido, 10% de proteínas, 5% de lipídeos e 2% de açúcares (TOSELLO, 1987). Além disso, tem sido usado também para a produção de álcool de cereais e biocombustíveis (MACKAY, 2009). A energia é um requerimento nutricional muito importante sendo o milho, por esse motivo um dos cereais mais cultivados do mundo, perdendo apenas para o trigo e o arroz respectivamente (BALDO, 2007; TOSELLO, 1987). O Brasil atualmente é o terceiro maior produtor de milho,

ficando atrás dos Estados Unidos e da China (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO, 2009). A área estimada com a primeira safra de milho 2009/2010 no Brasil com produção de cerca de 32.347 milhões de toneladas, é de 8.281 milhões de hectares. Esses dados mostram uma redução de 3,9% em relação à safra passada (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010). Já a segunda safra chega a 20.265 milhões de toneladas. Quanto à produção mundial de milho, estima-se que ela atinja quase 805 milhões de toneladas em 2010 (FAO, 2009).

## **2.2 O alagamento e seus efeitos sob as plantas**

A condição de alagamento pode ocorrer por diferentes fatores naturais e antrópicos, como a elevação dos níveis dos rios, ação de chuvas intermitentes ou tempestades, cheias periódicas, drenagem inadequada do solo, excesso de irrigação entre outros (KOZLOWSKI, 1997). É considerado um fator ambiental relativamente comum em áreas cultivadas e gera dificuldades para a produção agrícola e também florestal (ANDRADE et al., 1999).

Estima-se que no Brasil haja 28 milhões de hectares de terra com potencial agricultável que sofrem com o alagamento (SILVA, 1986) e as mudanças climáticas induzidas pelo aquecimento global podem aumentar a frequência e severidade dos eventos de chuvas, intensificando ainda mais esse tipo de estresse (ARNELL; LIU, 2001). Os solos que estão sob alagamento têm como principal característica problemas na aeração, o que leva a baixas ou nenhuma concentração de oxigênio conhecidos como hipoxia e anoxia respectivamente (ALVES, 2002; ZAIDI; RAFIQUE; SINGH, 2003). Modificações na estrutura e nas funções das membranas, resultantes da peroxidação de seus lipídeos são alguns dos danos causados por esse tipo de estresse já bem caracterizadas (CAKMAK; HORST,

1991, DEUNER et al., 2008), podendo produzir danos ao funcionamento e à estrutura celular (FRIES et al., 2007; MITTLER et al., 2004).

As plantas submetidas a esse estresse sofrem uma série de alterações que as auxiliam a suportarem as baixas concentrações de oxigênio. Duas adaptações de plantas a essa condição mais bem conhecidas são a formação de aerênquimas (ARIKADO; ADACHI, 1955; ARMSTRONG et al., 1991; BURDICK, 1989; JAT et al., 1975; MCDONALD; GALWEY; COLMER, 2001) e o desenvolvimento de raízes adventícias (BIRD, 2000; LIZASO; MELENDEZ; RAMIRES, 2001; MANO et al., 2005). Aerênquima é uma especialização do tecido parenquimático em que se desenvolvem grandes espaços intercelulares preenchidos por gases, geralmente interligados, formando uma fase gasosa contínua que se ramifica por todo o tecido (EVANS, 2004; MAUSETH, 1988).

Outras adaptações morfo-anatômicas vêm sendo caracterizadas, tais como raízes mais finas e compridas, diminuição da exoderme, modificações no córtex e nos vasos condutores nas raízes, alterações nas folhas (PEREIRA et al., 2008; SOUZA et al., 2009) e nas vias metabólicas como a passagem da respiração aeróbica para a anaeróbica que é menos eficiente na produção de energia (SERRES; VOESENECK, 2008). A formação de aerênquimas, pode ter sua origem de forma esquizogênica ou lisígena (BARY, 1884 citado por EVANS, 2004). Os aerênquimas esquizogênicos são derivados da separação entre as células, e os lisígenos são derivados da morte das células corticais (GUNAWARDENA, 2001a). Os aerênquimas lisígenos podem ser induzidos por hipoxia ou outros tipos de estresse como altas temperaturas, seca ou deficiência de nutrientes (GUNAWARDENA, 2001a).

### **2.3 As enzimas do sistema antioxidante e sua relação com a tolerância ao alagamento**

Durante o alagamento ocorre um aumento descontrolado de radicais livres nas células levando à produção de diferentes espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam prejuízos ao metabolismo da planta por promover a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (FOYER et al., 1997; FRIES et al., 2007; MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). A formação de EROs é uma condição normal do metabolismo aeróbico causada pela presença do O<sub>2</sub> no ambiente celular (RICE-EVANS et al., 1991). Para a proteção das membranas celulares e organelas dos efeitos danosos das EROs, as células das plantas possuem um sistema de defesa antioxidante formado por componentes enzimáticos e não enzimáticos responsáveis por manter um balanço de EROs dentro das células. Algumas das enzimas que fazem parte do sistema antioxidante e atuam na remoção desses EROs e conseqüentemente auxiliam na adaptabilidade das plantas, são enzimas da classe das peroxidases, do ciclo do ascorbato e da catalase (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). O balanço entre a formação e a eliminação dos EROs é fundamental para a sobrevivência celular. Dessa forma, a capacidade antioxidante das plantas é considerada um fator importante para a proteção das mesmas a diferentes estresses ambientais (BARTOSZ, 1997; YEN et al., 1998).

Pereira et al. (2010) observaram que ao longo dos ciclos de seleção da variedade de milho “Saracura” sob encharcamento houve uma alteração na atividade de enzimas radiculares relacionadas ao estresse oxidativo, resultando em um aumento de atividade da catalase, da peroxidase do guaicol e da peroxidase do ascorbato. Os mesmos autores observaram também um incremento na densidade de aerênquimas nas raízes do milho Saracura, sugerindo uma relação entre a atividade enzimática do sistema antioxidante e o aumento do número de aerênquimas, duas características que auxiliam na tolerância dessa variedade de milho ao alagamento. Porto (2010), ao estudar o perfil de expressão temporal do gene da superóxido dismutase nesse estresse em coleótilos de milho Saracura constatou que nos

primeiros dias a sua expressão decrescia, voltando a subir ao fim de 6/7 dias de alagamento.

### **2.3.1 Superóxido Dismutase (SOD)**

A superóxido dismutase é considerada uma enzima chave no sistema antioxidante das plantas por remover o radical superóxido e controlar outras EROs, sendo o produto da sua reação o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio molecular ( $O_2$ ). Essa enzima pode ser encontrada em todos os compartimentos celulares suscetíveis ao estresse oxidativo (BOWLER; VAN MONTAGU; INZÉ, 1992). É a única enzima que pode determinar a concentração de  $O_2$  e  $H_2O_2$ , sendo desse modo, central no mecanismo de defesa, pois previne a formação do radical hidroxila (OH). Porém o  $H_2O_2$  também é tóxico para a célula e precisa ser detoxificado pela catalase e/ou peroxidases (LÉON et al., 2002).

### **2.3.2 Catalase (CAT)**

A catalase (CAT) foi uma das primeiras enzimas a ser isolada no início do século XX. É uma das enzimas envolvidas na remoção de EROs, principalmente peróxidos tóxicos, catalisando a reação que converte peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio molecular ( $O_2$ ) (FRUGOLI et al., 1996; MITTLER, 2002). Essa enzima pode ser encontrada no citosol, mitocôndrias, cloroplastos e principalmente nos peroxissomos, onde sua atividade é mais alta (CAKMAK; DRAGANAS; HORST, 1993; NEMOTO; OTSUKA; ARAKAWA, 1996; WILLEKENS et al., 1995). Pertence à família das oxirredutases, presente universalmente nos organismos que decompõe  $H_2O_2$  em água e em oxigênio molecular (MORITA et al., 1994).



Existem várias isoenzimas da catalase codificadas por diferentes genes cuja expressão pode ocorrer nas folhas, nas flores e nas raízes. Em *Arabidopsis thaliana* já foram identificadas seis formas da enzima, sendo as mais expressas as Catalases 1, 2 e 3 codificadas respectivamente pelo genes Cat1, Cat2 e Cat3. A Cat1 é a mais importante para as plantas sendo responsável por 80% da atividade dessa enzima (FRUGOLI et al., 1996; SCANDALIOS, 1993). Diversos trabalhos relatam que a atividade da catalase pode ser alterada por fatores ambientais variados como a temperatura, a radiação UV, a contaminação do solo por metais pesados e o estresse hídrico, tanto a seca quanto o alagamento (POMPEU, 2005; XING; JIA; ZHANG, 2007).

### **2.3.3 Peroxidase do Ascorbato (APX)**

A enzima Peroxidase do Ascorbato é muito importante para o sistema antioxidante das plantas, pois atua na detoxificação do  $H_2O_2$  utilizando o ascorbato como substrato (NOCTOR; FOYER, 1998; WILLEKENS et al., 1995). Ela é encontrada nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e citosol (CAKMAK; DRAGANAS; HORST, 1993).

A atividade da APX aumenta ao longo do tempo, assim como atividade de outras enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a glutatona redutase (GR) e a catalase (CAT) em resposta a diversos estresses ambientais como o ozônio ( $O_3$ ), luminosidade, salinidade, patógenos e metais pesados (SHIGEOKA et al., 2002; WILLEKENS et al., 1995). Pereira et al. (2010) mostraram que alterações na atividade dessa enzima pode ter relação com a formação de aerênquima em raízes de milho sob alagamento.

## **2.4 A parede celular e o aerênquima**

A parede celular é um compartimento dinâmico, que pode facilmente sofrer alterações e é considerada o componente mais resistente dos vegetais (CARPITA, 1998). Sua constituição se baseia em uma parede primária, formada na fase de crescimento com grande expansão celular, uma parede secundária, formada pela diferenciação de várias células no interior da parede primária e uma lamela média, rica em pectato de cálcio, presente na junção das paredes vizinhas (TAYLOR, 2008).

A parede celular e lamela média são constituídas por diversos tipos de moléculas poliméricas. Celulose, hemicelulose, polissacarídeos pécnicos e proteínas são alguns exemplos, os quais variam em conteúdo e estrutura química de acordo com a espécie e estágio de desenvolvimento. De um modo geral, a celulose tem a função de conferir resistência e rigidez, e as hemiceluloses e substâncias pécnicas promovem elasticidade e plasticidade à parede celular (TAYLOR, 2008).

A parede celular é essencial para a maioria dos processos de crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução dos vegetais. Sendo também responsável por dar resistência mecânica às estruturas, promover a junção de células vizinhas, atuar como exoesqueleto controlando a forma das células e protegê-las contra agressões físicas e químicas (TAYLOR, 2008). Em estudos de paredes celulares de coleóptilos de milho, Inouhe e Nevins (1997) constataram que eram formadas predominantemente de arabinose, xilose e glicose como açúcares neutros de polissacarídeos não celulósicos. Apesar de se conhecer a composição básica da parede celular de milho, as modificações causadas por hipoxia ou anoxia são ainda pouco exploradas, principalmente a nível molecular. Mc Pherson (1939), um dos primeiros pesquisadores a estudar a formação de aerênquimas em raízes de milho alagadas, atribui ao colapso das células corticais decorrente da perda de turgidez celular a causa primária do desenvolvimento dos espaços intercelulares. Hoje, no entanto, sabe-se que a hipoxia estimula a produção de etileno (DREW; HE; MORGAN, 1989; HE et al., 1996a; HE; MORGAN; DREW, 1996b;

KAWASE, 1972) que, por sua vez, provoca a indução de enzimas que atuam no metabolismo da parede celular culminando na formação de aerênquimas (DANTAS; ARAGÃO; ALVES, 2001; GUNAWARDENA, 2001a ; HE et al., 1996a).

Diversos trabalhos relacionam a desestruturação da parede celular em conjunto com o estresse oxidativo à formação de aerênquimas (DANTAS; ARAGÃO; ALVES, 2001; EVANS, 2004; GUNAWARDENA, 2008; PORTO, 2010; VITORINO et al., 2001). Em raízes e coleótilos de plântulas de milho “Saracura”, a hipoxia induziu o desenvolvimento de grandes espaços intercelulares em resposta ao aumento da atividade de enzimas de degradação e afrouxamento da parede celular como a XET (xiloglucano endotransglicosilase) e celulase. Neste trabalho, foi analisado somente a expressão do gene da enzima XET e por isso será dado um enfoque maior a essa enzima (DANTAS; ARAGÃO; ALVES, 2001; PEREIRA et al., 2010).

#### **2.4.1 Xiloglucano endotransglicosilase (XET)**

A XET é uma enzima de afrouxamento da parede celular relacionada à formação de aerênquimas esquizógenos (SAAB; SACHS, 1996). A enzima xiloglucana endotransglicosilase está envolvida em processos de modificação da parede celular das plantas, incluindo síntese e degradação de compostos. A XET catalisa a quebra de polímeros de xiloglucanas, principal composto de proteínas estruturais da parede celular que se associam às frações de hemicelulose, celulose, pectinas e outras. Essa enzima também permite a expansão da célula sem danificar sua estrutura, provavelmente alterando a estrutura da parede pela adição de novos polímeros de xiloglucanas o que permite o crescimento da planta (CAMPBELL; BRAAM, 1999).

## 2.5 O milho BRS-4154 “Saracura”

Entre as plantas cultivadas, o milho é classificado como uma das mais sensíveis à condição de hipoxia, de forma que, em áreas sujeitas ao alagamento, o cultivo desse cereal é bastante restrito (PARENTONI et al., 1997). Visando diminuir esse problema e explorando as conhecidas variações de tolerância às condições de inundação por diferentes espécies vegetais, a Embrapa Milho e Sorgo, após nove ciclos de seleção, lançou no mercado, em 1997, a variedade de milho BRS 4154, também conhecida como “Saracura”, que possui como principal característica a tolerância a períodos intermitentes de inundação do solo. Entre as características agrônômicas dessa variedade estão o ciclo precoce, altura da planta em torno de 2,35 m, altura da espiga de 1,32 m, produtividade média de 5 a 6,5 T/ha, ótima resistência ao acamamento e quebramento e grão do tipo semi-duro de cor laranja (PARENTONI et al., 1997).

Os primeiros estudos fisiológicos da tolerância à baixa disponibilidade de oxigênio no meio, sob condições controladas em sala de crescimento, mostraram que o “Saracura” apresentou índices percentuais de sobrevivência no primeiro e segundo dia de hipoxia superiores ao BR 107, que é uma variedade sensível ao alagamento (VITORINO et al., 2001). Após o quarto dia de hipoxia, as plantas do BR 107 mostraram sua sensibilidade à deficiência de oxigênio no meio apresentando taxa de sobrevivência próxima de zero. No mesmo período o percentual de sobrevivência do Saracura foi de 73% (VITORINO et al., 2001). Em estudos com uma linhagem de milho norte-americana, o B73Ht, Lemke-Keys e Sachs (1989) verificaram que após 3 e 4 dias de hipoxia, as plântulas demonstraram melhor desempenho na taxa de sobrevivência que o BR107 chegando a 61% e 14% respectivamente, mas ainda muito inferior ao Saracura que mesmo após 5 dias sob estresse apresentou índices de 29% de sobrevivência. A variedade Saracura apresentou queda nos níveis de sobrevivência apenas a partir do

quarto dia de hipoxia. Após esse período foi possível observar na região do mesocótilo, um aspecto translúcido com intensa lise celular. Com o prolongamento do estresse, as plântulas mostraram-se flácidas, formando uma forte constrição nessa região causando o tombamento e conseqüentemente a morte das mesmas (VITORINO et al., 2001).

Desde o seu lançamento comercial, vários estudos vêm sendo feito com o intuito de elucidar os mecanismos que conferem ao milho Saracura maior resistência ao alagamento. Dentre as várias adaptações, uma característica muito importante é o aumento na porcentagem de aerênquimas encontrados nos tecidos da parte aérea e da raiz em situação de hipoxia (DANTAS; ARAGÃO; ALVES, 2001; LOPES et al., 2005; PEREIRA et al., 2008). Dantas, Aragão e Alves (2001) concluíram que a hipoxia potencializou o desenvolvimento de aerênquimas, devido a uma maior atividade de enzimas do sistema antioxidante e também de degradação da parede celular como a celulase.

A formação de aerênquimas é uma das principais respostas à hipoxia e facilita a difusão de  $O_2$  e  $CO_2$  nos tecidos vegetais (BOURANIS et al., 2006). Lynch e Ho (2005) constataram também que a presença de algumas adaptações anatômicas como o aumento no número de aerênquimas, está associada à redução da energia metabólica para as raízes em crescimento, além de diminuir a densidade de tecido radicular. Recentemente, Souza et al. (2009) constataram também mudanças anatômicas na parte aérea do milho Saracura como diâmetro dos estômatos, aumento no número de feixes vasculares, diferenças na espessura da epiderme tanto abaxial como adaxial, diminuição do diâmetro das células buliformes, dentre outras características. Todas essas modificações tanto na parte aérea, como na raiz proporcionam ao milho Saracura maior tolerância ao alagamento em comparação com outras cultivares. Entretanto, ainda há escassez na literatura de estudos das bases moleculares dos eventos que desencadeiam essas modificações. O entendimento dessas bases pode levar a melhor compreensão dos

fenômenos fisiológicos da resposta ao alagamento e aplicação no melhoramento genético do milho e também de outras culturas.

## 2.6 PCR em tempo real

Uma importante técnica molecular que pode contribuir nos estudos multidisciplinares dessas relações é denominada PCR em tempo real. Essa técnica é relativamente recente, e apresenta alta sensibilidade e reprodutibilidade, com tempo de análise relativamente curto.

Em estudos com plantas essa técnica tem sido utilizada para determinar o número de inserções de T-DNA em plantas transgênicas (INGHAN et al., 2001; YANG et al., 2005), detectar a presença de organismos geneticamente modificados em alimentos (HERNANDEZ et al., 2001), quantificar o nível de transcritos em órgãos vegetais (HERNANDEZ et al., 2001; LAMMERS et al., 2001), estudar famílias de genes (JANG et al., 2004; YOKOYAMA; ROSE; NISHITANI, 2004) verificar o perfil de expressão de genes envolvidos na transdução de sinais, como a família do gene *CTR1* envolvida na sinalização do etileno (ADAMS-PHILLIPS et al., 2004), entre outras. Em milho essa técnica já foi empregada para analisar genes de resistência a vírus (UZAROWSKA et al., 2009), caracterizar perfis de expressão gênica durante o desenvolvimento das sementes, dentre outras aplicações (LUO et al., 2008). Em uma análise de PCR em tempo real é necessário pelo menos um gene de referência endógeno, que fornece um valor estimado da quantidade total do DNA na amostra, sendo que a amplificação de sequências específicas e sua quantificação relativa são baseadas nesse gene que deve possuir três requisitos: ser específico para a espécie, exibir baixo número de cópias e baixa heterogeneidade entre cultivares (DING et al., 2004; HERNANDEZ et al., 2001). Vários genes de referência já foram identificados em diferentes espécies, como por exemplo, o *zein* e *invertase 1* em milho (HURST; KNIGHT; BRUCE, 1999), que cumprem

perfeitamente os três requisitos acima para ser considerado gene de referência. Para milho também já foram identificados como genes de referência, a actina, GAPDH, ubiquitina, ADH, entre outros (LI; HE; JIN, 2009; LUO et al., 2008; SCHOLDBERG, 2009; SPOLLEN et al., 2008; UZAROWSKA et al., 2009; ZHANG et al., 2007). Essa técnica pode ser uma ferramenta bastante útil na análise da expressão de genes relacionados ao estresse. Baek e Skinner (2003) utilizaram com sucesso a técnica de PCR em tempo real para medir o nível de expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes em plantas de trigo submetidas a baixas temperaturas. Xia (2009) utilizou a mesma técnica para estudar a resistência de *Brassica* a diferentes estresses.

A quantificação de cDNA em tempo real pode ser alcançada por meio de sondas fluorogênicas ou através de agentes intercalantes, como o SYBRGreen (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004). A tecnologia SYBRGreen apresenta simplicidade e custo relativamente baixo quando comparada às demais e também permite gerar a curva de dissociação do DNA, sendo que existem softwares para calcular a temperatura de fusão ( $T_m$ ) do fragmento desejado após a PCR (FAJARDO et al., 2008). Essa tecnologia é baseada no monitoramento do aumento da intensidade de fluorescência após cada ciclo de PCR (RAMAKERS et al., 2003), sendo que esse aumento na fluorescência se deve ao fato do SYBRGreen se intercalar às fitas duplas de DNA. É importante ressaltar a falta de estudos de expressão gênica na variedade Saracura. Após anos de estudos sobre os mecanismos de tolerância dessa variedade (Saracura), constatou-se a existência de fortes evidências que as enzimas peroxidase do ascorbato (APX), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) exercem grande influência para a maior tolerância ao alagamento dessa variedade.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Local dos experimentos**

A etapa de germinação e alagamento foi realizada no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia, em sala de germinação e no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas.

Os cortes e análises anatômicas foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia. E toda a parte molecular foi realizada no Laboratório Central de Biologia Molecular. Todas as instalações estão situadas na Universidade Federal de Lavras.

#### **3.2 Material vegetal**

O material vegetal utilizado neste trabalho foram plântulas de milho da cultivar “Saracura” BRS-4154 obtidas a partir de cariopses colhidas em lavouras, dos ciclos de seleção 1 e 18 cedidos gentilmente pela Embrapa Milho e Sorgo localizada em Sete Lagoas, MG.

#### **3.3 Germinação e alagamento**

Para a germinação foram utilizadas bandejas de plástico de tamanho 34 x 28,5 cm, preenchidas com o substrato vermiculita e furadas no fundo para evitar o encharcamento do solo durante o processo.

As bandejas foram horizontalmente divididas ao meio com o auxílio de um barbante para separar os ciclos 1 e 18 onde foram colocadas cerca de 50 sementes por ciclo, totalizando 100 sementes por bandeja. Foi utilizado uma bandeja com os dois ciclos para diminuir possíveis interferências do meio. As sementes foram



dispostas nas bandejas, cobertas com uma camada fina de vermiculita e em seguida o substrato foi umedecido (Figura 1). As bandejas foram mantidas em sala de germinação com fotoperíodo de 12 h e temperatura ambiente ( $26^{\circ} \pm 2$ ) por 4 dias. As bandejas foram distribuídas na sala de germinação totalmente ao acaso, caracterizando um desenho experimental DIC (delineamento inteiramente casualizado).

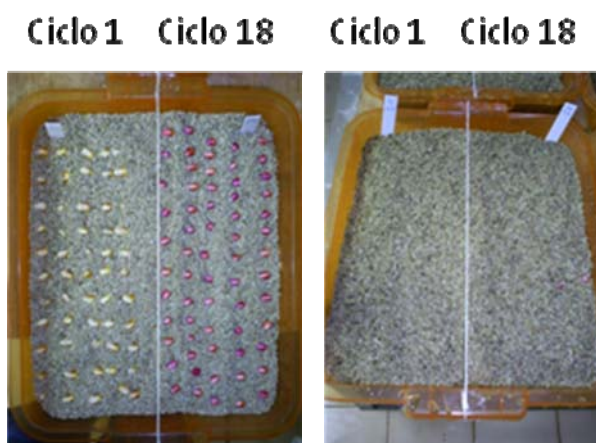


Figura 1 Germinação de sementes de dois ciclos, C1 e C18 do milho Saracura em vermiculita

Após o período de germinação os furos no fundo das bandejas foram vedados com Durepox© e em seguida foi adicionado água até formação de uma lâmina de 1 cm acima do nível do substrato (Figura 2). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 3 tratamentos consistindo dos diferentes tempos de alagamento (0 h, 12 h e 24 h) com 3 repetições cada, sendo cada bandeja considerada uma repetição.

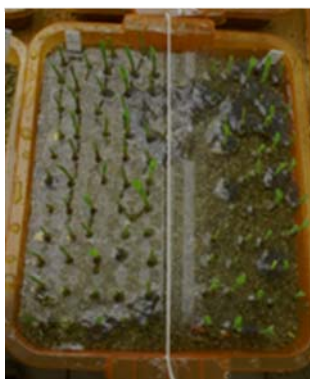
**Ciclo 1    Ciclo 18**

Figura 2 Plântulas do milho Saracura proveniente de dois ciclos de seleção alagadas após 4 dias de germinação

**3.4 Anatomia**

Para avaliações anatômicas foram retiradas 3 plântulas de cada repetição, coletadas a raiz primária de cada uma delas, fixadas em solução de formaldeído, ácido acético e etanol 70% (FAA) por um período de 72 horas, posteriormente sendo armazenadas em álcool 70% até a avaliação (KRAUS; ARDUIN, 1997). Para avaliação foram feitos cortes de todo o 2º centímetro da zona pilífera da raiz.

Os fragmentos de 2 cm removidos da região pilífera das raízes foram cortados em secção transversal com auxílio de micrótomo de mesa modelo LPC e clarificados com hipoclorito de sódio a 5%, por 10 min, reidratados por 10 min, corados com astrablau (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 das secções transversais. As fotomicrografias foram analisadas em software para análise de imagem UTHSCSA Imagetool medindo-se a área total do córtex, área dos aerênquimas e proporção da área do córtex ocupada por

aerênquimas. Foram realizadas 3 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.

Para análise estatística dos resultados foi feito o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3.5 qrtPCR**

#### **3.5.1 Extração de RNA**

Para a extração de RNA foi utilizada a metodologia TriReagente Sigma®, e o protocolo sofreu algumas modificações conforme descrito abaixo.

A cada 100 mg de tecido proveniente do 2º centímetro da zona pilífera de raiz do milho Saracura, previamente macerado em nitrogênio líquido, foi adicionado 1 mL de TriReagente Sigma® e a amostra submetida ao vórtex por 1 minuto. Após centrifugação por 10 minutos a 4°C e 12000 g, o sobrenadante foi transferido para tubo novo e mantido a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 200µL de clorofórmio para cada 1 mL de TriReagente Sigma® e homogeneizado por 15 segundos. A mistura foi mantida em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada por 12000 g durante 15 minutos a 4°C. A fase superior resultante desse processo foi transferida para novo tubo onde foi novamente adicionado 200 µL de clorofórmio, mantido a temperatura ambiente e centrifugado. Essa etapa foi repetida 3 vezes, e após a última repetição, foram adicionados 500 µL de isopropanol por 1 mL de TriReagente Sigma®. O material foi então deixado em freezer -20°C para precipitação por 1 h ou overnight, quando necessário. Após a precipitação, foi feita uma centrifugação a 12000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi descartado e adicionado 1 mL de

etanol 75% no precipitado, com uma suave homogeneização. Foi feita então, uma centrifugação a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Foi retirado todo excesso de álcool e os tubos mantidos em forno a 37°C para completa secagem. Após a secagem a ressuspensão foi feita com 20µL de água Miliq autoclavada.

A verificação da quantidade de RNA e da qualidade da extração foi feita através de quantificações em NanoDrop ND 1000 a 260nm e eletroforese em gel de agarose 2% corado com Brometo de etídeo.

Após as extrações dos ácidos nucleicos as amostras foram tratadas com DNase Free para livrá-las de qualquer contaminação com DNA. Para isso foi utilizado o Kit DNase Turbo Free® AMBIOM e protocolo realizado conforme recomendações do fabricante. Foram adicionados 10 ug de RNA a 2 uL de DNaseI e 0,1 vol 10 X tampão DNase I. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. Depois desse período, foi adicionado 0,1 vol de DNase inactivation e incubado novamente por 2 minutos em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, os tubos foram centrifugados a 7500g por 1,5 minutos e os sobrenadantes transferidos para novos tubos.

Para comprovar a eficiência da descontaminação foi feito um gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo onde se esperava visualizar somente as bandas correspondentes ao RNA, sem nenhum rastro de DNA.

### **3.5.2 Síntese de cDNA**

Após o processo de extração e purificação de RNA, foi realizada a síntese de cDNA. Para isso foi utilizado kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription cDNA®* da *Applied Biosystems*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante como descrito abaixo.

Em eppendorfs 0,5 mL foram adicionados 10 µL de RNA e água na concentração de 1 µg/µL. A essa mistura de RNA e água foi adicionado 10 µL do

mix contendo 2  $\mu\text{L}$  de *RT Buffer*, 0,8  $\mu\text{L}$  de dNTP mix, 2  $\mu\text{L}$  de *Random Primers*, 1 $\mu\text{L}$  de *Multi Scribe RT* e 4,2  $\mu\text{L}$  de água. Os tubos foram submetidos a um rápido spin e levados ao termociclador, nas seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C até a retirada dos tubos do aparelho.

A eficácia da síntese de cDNA foi comprovada por meio de PCR convencional com todas as amostras, onde se esperava a amplificação das mesmas. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de DNA genômico de milho cedido pelo Setor de Genética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, e utilizado o primer do gene endógeno Ubiquitina. Foi feito um gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo para visualização das amplificações.

### **3.5.3 Desenho de primers e montagem das placas de qrtPCR**

Para análise da expressão gênica por qrtPCR, os primers a serem utilizados foram desenhados com o auxílio do programa Primer Express 3 da Applied Biosystems, após a busca das sequências no site NCBI (Tabela 1). Como genes endógenos foram utilizados os genes da Ubiquitina e ADH (LIVAK; SCMITTGEN, 2001; SCHOLDBERG, 2009).

Tabela 1 *Primers* utilizados na análise de qRT-PCR

Gene	Orientação	Sequência 5' -----3'	Amplicom (pb)
<b>Peroxidase do</b>	<i>Foward</i>	GCTGAGTGACCCTGTCTTCC	102
<b>Ascorbato APX</b>	<i>Reverse</i>	AGTTCGGAGAGCCTTGAGGTG	102
<b>Catalase – CAT 1</b>	<i>Foward</i>	CCAAACTATCTGATGCTTCC	63
	<i>Reverse</i>	ATCATGGTGGTTATTGTGGT	63
<b>Xiloglucano endotransglicosilase XET</b>	<i>Foward</i>	TCTACCTGTCGTCGCAGAACTC	98
	<i>Reverse</i>	CCGGTTGCCAGGAACT	98
<b>Superóxido</b>	<i>Foward</i>	GCATAGCCGAGGCAACCAT	106
<b>Dismutase SOD</b>	<i>Reverse</i>	AACTGAATTTGCGCCAGTCAA	106
<b>Ubiquitina (controle)</b>	<i>Foward</i>	AAGGCCAAGATCCAGGACAA	69
	<i>Reverse</i>	TTGCTTTCCAGCGAAGATGA	69
<b>Desidrogenase</b>	<i>Foward</i>	AGGACGCTGAGTTAAGACC	104
<b>Alcoolica ADH (controle)</b>	<i>Reverse</i>	CACATTTGGCAGATCAGTGC	104

As amostras de cDNA sintetizados foram utilizadas como template para a análise da expressão gênica quantitativa pelo aparelho ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (*Applied Biosystems*™), utilizando como sistema de detecção o SYBR Green, que se baseia na capacidade intercalante às fitas duplas do cDNA.

Antes da análise de expressão gênica foi feito um ensaio de quantificação absoluta para se determinar a eficiência dos *primers* e a melhor diluição das amostras a ser utilizada. Foram feitas 6 diluições seriadas na escala de 10X, iniciando na diluição 1/10. A diluição das amostras de cDNA escolhida foi a de 1/10 e a eficiência dos *primers* estabelecida entre 94 e 97%. Após essas análises, foi realizado o ensaio de expressão gênica relativa, usando o método do CT comparativo.

As amostras foram processadas em triplicatas e com três repetições biológicas cada uma. As reações foram feitas seguindo as seguintes condições térmicas: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, finalizando com 1 segundo a 95°C. Para cada reação, foram utilizados 1 µL de cDNA, 0,2 µL de cada *primer* e 5,0 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*™), completadas com 3,6 µL de água Milliq autoclavada para um volume final de 10 µL. Os dados foram analisados no programa 7500 Fast Software (Versão 2.0.3).

Cada amostra foi normalizada com a média dos controles endógenos utilizados, Ubiquitina e Álcool Desidrogenase (ADH), usando a equação  $\Delta C_T = C_T$  (gene alvo) -  $C_T$  (controle endógeno) e a quantificação relativa foi obtida pela fórmula  $2^{-\Delta C_T}$ . A linha de corte (*Threshold*) foi definida manualmente. Após análise dos dados gerados pelo programa 7500 Fast Software (Versão 2.0.3), os resultados foram exportados para o programa Microsoft Excel para realização dos cálculos de  $\Delta CT$ ,  $\Delta\Delta CT$ , da quantificação relativa (RQ) e posterior construção dos gráficos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Análises anatômicas

Pelos resultados apresentados na Tabela 2 pode-se perceber diferenças significativas na proporção da área total do córtex ocupada por aerênquimas, tanto entre os ciclos quanto dentro de cada ciclo quando se considera os diferentes tempos de alagamento. O ciclo 1 mostrou menor proporção de área com aerênquimas quando comparado com o ciclo 18 e dentro dos dois ciclos o que se pode notar foi um aumento gradativo dessa área com o aumento do tempo de alagamento (Tabela 2, Figura 3).

Tabela 2 Proporção da área total de aerênquima em relação à área total do córtex (PA) em raízes de milho da cultivar Saracura no ciclo de seleção 1 sob diferentes tempos de encharcamento

<b>Ciclo 1</b>	<b>PA(%) C1</b>	<b>Ciclo 18</b>	<b>PA (%) C18</b>
0h	4,36 A a	0 h	6,9 B a
12h	11,57 A b	12 h	12,03 B b
24h	15,75 A b	24 h	19,55 B c

As letras maiúsculas mostram as diferenças entre os ciclos e as letras minúsculas entre os diferentes tempos de alagamento dentro do mesmo ciclo



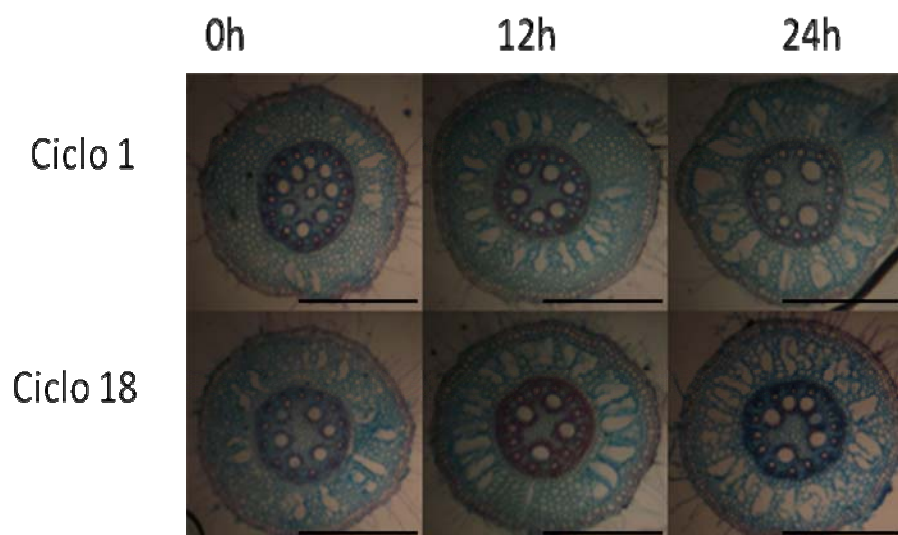


Figura 3 Formação de aerênquimas em raízes de milho Saracura de dois ciclos de seleção, após encharcamento, do substrato Barras = 100  $\mu\text{m}$

Esses resultados estão de acordo com aqueles observados por Pereira et al. (2008) ao verificarem que para o milho Saracura no estágio V6 (com seis folhas completamente desenvolvidas) os aerênquimas ocuparam uma área na região do córtex de 8,7% e 49,01% nos ciclos 1 e 18, respectivamente, após dois meses de estresse. Embora haja diferenças contrastantes entre esta pesquisa e a desenvolvida por aqueles autores respectivamente como a idade das plantas (plântulas/adultas), o sistema de imposição do estresse (bandeja com vermiculita/vaso com terra), as condições ambientais (sala de crescimento/casa de vegetação), o tempo de duração do estresse (um dia/60 dias), os resultados semelhantes comprovam que as respostas fisiológicas e provavelmente também as moleculares mantêm um padrão de comportamento no que diz respeito ao desenvolvimento de aerênquimas em resposta ao alagamento. Parentoni et al. (1997) também verificaram o aumento da porosidade nas raízes de milho Saracura do ciclo 1 para o ciclo 4, porém com

tempos maiores de alagamento que os do presente trabalho. Com relação à pesquisa desenvolvida por Pereira et al. (2008) o objetivo foi o de estudar a evolução da formação de aerênquimas em diversos ciclos de seleção enquanto no presente caso, foi o de estudar a expressão de alguns genes relacionados aos eventos iniciais da formação de aerênquimas. Os dados aqui encontrados também estão de acordo com aqueles verificados por Dantas, Aragão e Alves (2001) e Lopes et al. (2005) que trabalharam em condições semelhantes. Segundo esses autores, a formação de aerênquimas em plântulas de milho Saracura ocorre nas primeiras horas de hipoxia, ocupando em média, 12% da área do córtex até 24 h de estresse. A partir daí, aumenta progressivamente até atingir 50% da área total do córtex após quatro dias sob estresse.

De acordo com Pereira et al. (2008), houve estímulo para a formação de aerênquima no córtex da raiz à medida que se avançavam os ciclos de seleção genética e os resultados aqui encontrados, concordam com essa afirmativa. Essas estruturas permitem a oxigenação interna dos tecidos radiculares (BOURANIS et al., 2006), o que é fundamental para manter o metabolismo aeróbico na raiz, ainda que em ambientes hipóxicos ou anóxicos (GUNAWARDENA, 2008; INSAUSTI et al., 2001). Portanto essa estratégia permite ao milho 'Saracura' crescer e sobreviver por períodos de tempo maiores que outras cultivares que não apresentam tais estruturas.

Trabalhos anteriores (ALVES et al., 2002; PEREIRA et al., 2008; PEREIRA et al., 2010; SOUZA et al., 2009) relataram superioridade do milho 'Saracura' em relação à cultivar BR 107, no que se refere à tolerância ao alagamento, o que é condizente com o aumento na proporção do córtex ocupada pelo aerênquima relatada no presente trabalho e em outros (DANTAS; ARAGÃO; ALVES, 2001; LOPES et al., 2005; PEREIRA et al., 2008; PEREIRA et al., 2010; SOUZA et al., 2009).

#### **4.2 Expressão de genes das enzimas do sistema antioxidante e de parede celular**

Os resultados das análises de expressão gênica em raízes de milho Saracura para o ciclo de seleção 1 mostram uma alta expressão dos genes das enzimas XET e APX logo após a germinação. Enquanto os da CAT e SOD mostram expressão em níveis baixos (Gráfico 1).

Após 12 h sob hipoxia os níveis de expressão de todos os genes estudados caíram, porém manteve-se o padrão de expressões mais altas de APX, seguida pela XET e baixos níveis de expressão de CAT. Para a SOD não foi detectada nenhuma atividade gênica (Gráfico 2).

Passadas 24 h do estresse, os níveis de expressão dos genes voltaram a aumentar, sem, no entanto voltar aos níveis iniciais, porém mantendo-se o mesmo padrão observado após a germinação (Gráfico 3).

Os resultados das análises de expressão gênica em raízes de milho Saracura do ciclo de seleção 18 seguiram o mesmo padrão do ciclo 1 com expressões mais altas dos genes APX e XET, respectivamente, seguidas pela CAT e SOD em níveis bem mais baixos. De maneira geral, o nível de expressão de todos os genes começa elevada, (Gráfico 1), caindo após 12 h de alagamento (Gráfico 2) e voltando a subir após 24 h (Gráfico 3), porém sem chegar ao nível inicial.

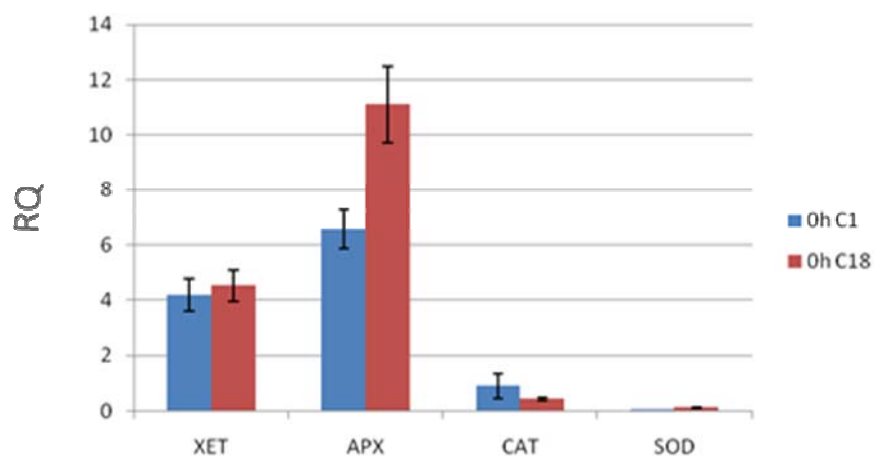


Gráfico 1 Expressão dos genes XET, APX, CAT e SOD em raízes de milho Saracura de dois ciclos de seleção, após a germinação

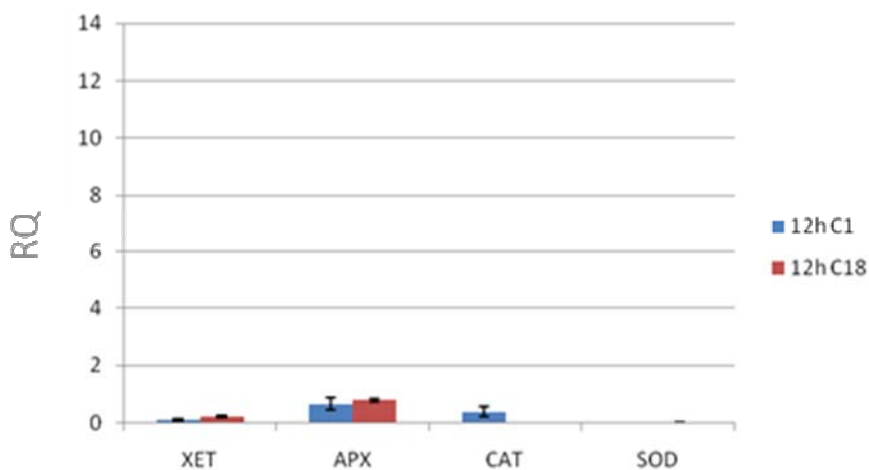


Gráfico 2 Expressão dos genes XET, APX, CAT e SOD em raízes de milho Saracura de dois ciclos de seleção, após 12 h de hipoxia

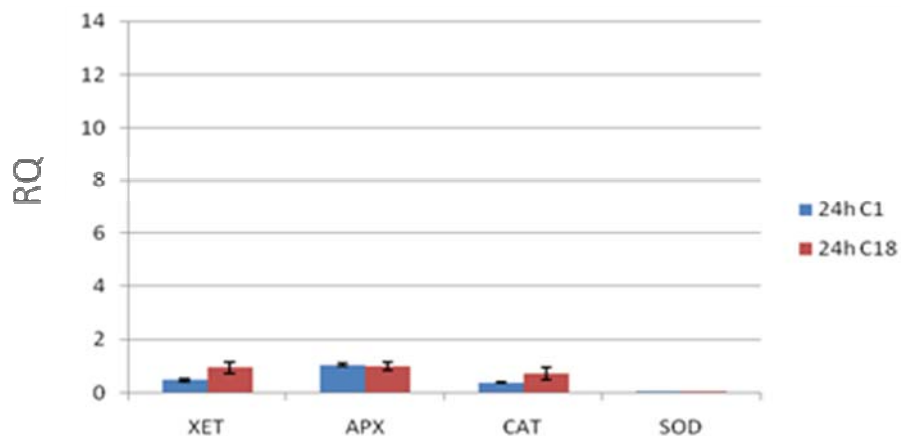


Gráfico 3 Expressão dos genes XET, APX, CAT e SOD em raízes de milho Saracura de dois ciclos de seleção, após 24 horas

Ao comparar a expressão dos genes entre os dois ciclos de seleção, verifica-se que o gene CAT apresentou maior nível de expressão gênica no ciclo 1 em comparação com o ciclo 18 às 12 h de alagamento e que APX às 24 h de estresse também. O gene da SOD não mostrou expressão nos dois ciclos após 12 e 24 h de estresse respectivamente. O gene XET mostrou maior expressão no ciclo 18 que no ciclo 1 em todos os tempos de alagamento (Gráfico 4).

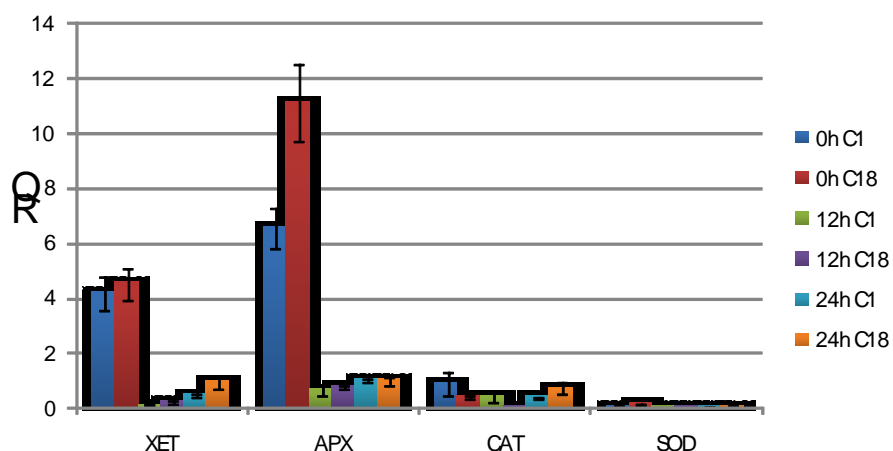


Gráfico 4 Expressão dos genes XET, APX, CAT e SOD em raízes de milho Saracura de dois ciclos de seleção. Após a germinação, 12 h e 24 h de hipoxia

Esses resultados sugerem que as raízes de milho desse último ciclo, são mais responsivas ao déficit de oxigênio por ativar em maior escala a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo. De fato, muitas pesquisas têm mostrado que estes dois tipos de estresse estão intimamente relacionados sendo, normalmente, o segundo consequência do primeiro (DEUNER et al., 2008; EVANS, 2004; GUNAWARDENA et al., 2001; ZANANDREA, 2009). Para o milho Saracura em particular, diversos trabalhos relacionam a atividade das enzimas XET, APX, CAT e SOD com o aumento da tolerância ao alagamento, característica de maior interesse na cultivar Saracura (DANTAS; ARAGÃO; ALVES, 2001; LOPES et al., 2005; PEREIRA et al., 2010; PORTO, 2010). Os resultados dessas pesquisas mostram que a tolerância ao estresse anaeróbico, pode ser aprimorada pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes (BIERMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998; JIANG; HUANG, 2001; MEHLHORN et al., 1996; MONK; FAGERSTEDT; CRAWFORD, 1987). No presente trabalho, o

aumento da tolerância do milho Saracura e a expressão desses genes do ciclo 1 para o ciclo 18 comprovam esses resultados.

Pereira et al. (2010) trabalharam com o milho Saracura no estágio V6 objetivando verificar a influência de sucessivos ciclos de seleção do milho 'Saracura' na atividade das enzimas do sistema antioxidante e a relação dessas enzimas com a capacidade de desenvolver aerênquima após 60 dias de encharcamento intermitente. Nesse trabalho eles concluíram que as enzimas catalase e peroxidase do guaiacol apresentaram menor atividade nos ciclos finais de seleção do milho 'Saracura', enquanto a peroxidase do ascorbato apresenta comportamento contrário. Concluíram, portanto que a redução na atividade das enzimas do sistema antioxidante parece estar relacionada a um desbalanço na decomposição de  $H_2O_2$  o que pode contribuir para a maior formação de aerênquimas nos ciclos finais. Neste trabalho foi dada continuidade a esses estudos, na tentativa de verificar a expressão de alguns genes relacionados aos mecanismos do sistema antioxidante (APX, CAT e SOD) e de parede celular (XET).

A hipoxia induz a atividade de celulase e XET e provoca certos desarranjos dos componentes da parede celular favorecendo a formação de aerênquimas (BRETT; WALDRON, 1990; VITORINO et al., 2001). Porto (2010) ao estudar a expressão do gene da enzima poligalacturonidase que possui ação similar a XET em coleótilos de milho Saracura, demonstrou que sua expressão é alta logo após a germinação, decrescendo após 4 e 5 dias de hipoxia, voltando a subir no 6º dia. O produto do gene XET, enzima com o mesmo nome e uma das responsáveis pelo afrouxamento da parede celular, proporciona por meio da sua atividade, maior flexibilidade da mesma, o que permite o crescimento e desenvolvimento da plântula logo após a germinação da semente (ASADA, 1999; FRIES et al., 2007; PORTO, 2010). Esse fato pode explicar a alta expressão do gene da XET após a germinação e sua queda após 12 h de alagamento.

Os aerênquimas formados em raízes de milho induzidos por hipoxia são considerados de origem lisígena induzidos por morte celular programada e com alta atividade da celulase, que é uma enzima de degradação de parede celular (DANTAS; ARAGÃO; ALVES, 2001; GUNAWARDENA, 2001a; GUNAWARDENA, 2001b). A atividade de enzimas do afrouxamento da parede celular está mais intimamente ligada à formação de aerênquimas esquizógenos (SAAB; SACHS, 1996) que é mais comumente encontrado nos estádios iniciais do alagamento em coleótilos de milho (DANTAS; ARAGÃO; ALVES, 2001).

A alta atividade das enzimas do sistema antioxidante logo após a germinação se dá devido à neutralização de radicais livres formados durante a germinação e crescimento (ASADA, 1999; FRIES et al., 2007; PORTO, 2010). O radical superóxido é o primeiro a ser formado e sua detoxificação ocorre em uma reação catalisada pela SOD (ASADA, 1999). O produto dessa reação,  $H_2O_2$ , é também tóxico às plantas e precisa ser detoxificado por outras enzimas como APX ou CAT (LÉON et al., 2002). O padrão de expressão gênica observado no presente trabalho pode ser explicado com base nessas relações tanto para o ciclo 1 como para o ciclo 18. Como a SOD é a primeira enzima do sistema antioxidante sua atividade ocorreu durante o processo de germinação gerando  $H_2O_2$  que precisa ser eliminado pelas peroxidases e catalases, justificando a alta expressão de seus genes, principalmente APX logo após esse período. A enzima SOD não sofre alterações com o alagamento, mantendo o seu nível de atividade igual ao de cultivares controles não resistentes (FRIES et al., 2007). Yan et al. (1996), verificaram reduções na atividade da SOD em milho sob períodos de alagamento, causando com isso aumento na concentração do radical superóxido nas células.

Diversos autores estudando a atividade de enzimas antioxidantes durante períodos de alagamento demonstraram que a atividade da APX é aumentada em detrimento da CAT (DANTAS; ARAGÃO; ALVES, 2001; LOPES et al., 2005; PEREIRA et al., 2010). Essa enzima (CAT) é especializada na remoção de



peróxidos tóxicos quando esses são encontrados em altas concentrações nas células (MITTLER et al., 2002) e a diminuição de sua atividade sugere que pode haver um acúmulo de EROs que não foram suficientemente removidos pela APX, mesmo essa tendo alta atividade (MADHUSUDHAN et al., 2003).

A maior formação de aerênquimas induzida pelo encharcamento das raízes de milho do ciclo 18 foi detectada após 12 horas de estresse (Tabela 2) período em que o nível de expressão gênica das enzimas do sistema antioxidante estudadas estava baixo em relação ao período inicial (Gráfico 2). Como discutido anteriormente, essa baixa expressão pode levar à diminuição da síntese de enzimas a eles relacionados e, portanto, ao acúmulo de EROs nas células. O acúmulo de EROs e seus efeitos é bem caracterizado e sabe-se que leva a peroxidação de lipídeos e até mesmo do material genético da planta levando a morte celular (CAKMAK; HORST, 1991; MITTLER et al., 2004; ZANANDREA, 2009) o que pode gerar os aerênquimas lisígenos. Com o passar do tempo de alagamento de 12 para 24 horas, os EROs acumulados ao funcionarem como sinalizadores moleculares em resposta a diversos estímulos, inclusive a hipoxia (NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2002) ativa a expressão desses genes (Gráfico 3) e admitindo-se uma relação direta entre nível de expressão e síntese enzimática, aumenta-se a atividade da APX e CAT. O aumento na atividade dessas enzimas seria então responsável pela diminuição do colapso celular e pela eliminação de radicais livres o que contribui para a tolerância e a consequente sobrevivência do milho Saracura durante períodos de hipoxia.

O aumento significativo na área de aerênquimas no córtex das raízes de milho do ciclo 18, ausente no ciclo 1, a partir das 12 horas de estresse quando comparada com os respectivos tempo zero, pode ser atribuído à maior formação de EROs naquela região e seus envolvimento já discutidos anteriormente. Essa hipótese pode ser comprovada uma vez que se constata uma maior expressão dos genes ligados ao estresse antioxidativo nas raízes das plantas do ciclo 18.

## 5 CONCLUSÕES

A alta expressão de todos os genes em estudo, detectada logo após a germinação pode ser explicada pela formação de EROs durante a germinação e crescimento e a maior flexibilidade da parede celular requerida nesses dois processos.

A menor expressão dos genes de enzimas do sistema antioxidante às 12 h pode ser relacionado ao acúmulo de EROs e conseqüentemente a maior formação de aerênquimas verificada após esse tempo, tanto no ciclo 1 quanto no ciclo 18.

EROs podem atuar como sinalizadores moleculares a partir das 12 h quando ocorre seu acúmulo, aumentando a expressão de genes relacionados ao sistema antioxidante proporcionando maior tolerância ao alagamento.

## REFERÊNCIAS

ADAMS-PHILLIPS, L. et al. Evidence that CTR1-mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose members display distinct regulatory features. **Plant Molecular Biology**, Netherland, v. 54, p. 387-404, 2004.

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

ANDRADE, A. C. S. et al. 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, out. 1999. (Suplemento).

ARIKADO, H.; ADACHI, Y. Anatomical and ecological responses of barley and some forage crops to the flooding treatment. **Bulletin Faculty Agriculture**, Cairo, n. 11, p. 1-29, 1955.

ARMSTRONG, W. et al. Modelling and other aspects of root aeration by diffusion. In: JACKSON, M. B.; DAVIES, D. D.; LAMBERS, H. **Plant life under oxygen deprivation: ecology, physiology and biochemistry**. The Hague: SPB, 1991. v.1, p. 267-283.

ARNELL, N.; LIU, C. Hydrology and water resources; in climate change. In: MCCARTHY, J. J. et al. **Contribution of working group II to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change**. Cambridge: Cambridge University, 2001. p. 191-233.

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

BAEK, K. W.; SKINNER, D.Z. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isobenic wheat lines. **Plant Science**, Oxford, v. 165, p. 1221-1227, 2003.

BALDO, M. N. **Comportamento anatômico, fisiológico e agrônômico do milho (*Zea mays* L.) submetidos a estresse de ambiente em diferentes estágios fenológicos**. 2007. 91 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2007.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologia Plantarum**, Warsaw, v. 19, n. 1, p. 47-64, 1997.

BIRD, R. M. K. A remarkable new teosinte from Nicaragua growth and treatment of progeny. **Maize Genetics Cooperative News**, Detroit, n. 74, p. 58-59, 2000.

BIERMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.

BOURANIS, D. L. et al. Dynamics of aerenchyma distribution in the cortex of sulfate-deprived adventitious roots of maize. **Annals of Botany**, Netherlands, v. 97, p. 695-704, 2006.

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

BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Hyman, 1990. 194 p.

BURDICK, D. M. Root aerenchyma development in *Spartina patens* in relation to flooding. **American Journal of Botany**, Holland, v. 16, n. 76, p. 777-780, 1989.

CAKMAK, I.; DRAGANAS, S.; HORST, M. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, n, 44, p.127–132, 1993.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, n. 4, p. 463-468, Aug. 1991.

CAMPBELL, P.; BRAAM, J. Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wallmodifying functions. **Plant Science**, Oxford, v. 4, n. 9, p. 361-366, 1999.

CARPITA, N. C. **The biology and biochemistry of the plant cell wall**. São Paulo: USP, 1998. (Notas de aula).

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

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

DESPRÉS, V. J. et al. Early allelic selection in maize as revealed by a scientist DNA. **Science**, New York, v. 302, n. 5648, p. 1206-1208, Nov. 2003.

DEUNER, S. et al. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 2, n. 55, p. 135-140, 2008.

DING, J. et al. Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes. **Jounal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 3372-3377, 2004.

DOEBLEY, J. The genetics of maize evolution. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 38, n. 1, p. 37-59, Dec. 2004.

DREW, M. C.; HE, C. J.; MORGAN, P. W. Decreased ethylene biosynthesis, and induction of aerenchyma, by nitrogen- or phosphate-starvation in adventitious roots of *Zea mays* L. **Plant Physiology**, Rockville, n. 91, p. 266-271, 1989.

EVANS, D. E. Aerenchyma formation. **New Physiologist**, Cambridge, v. 161, p. 35-39, 2004.

FAJARDO, V. et al. Real time PCR for quantitative detection of Chamois (*Rupicapra rupicapra*) e Pyrenean Ibex (*Capra pyrenaica*) in meat mixtures. **Journal of the American Organization of Analytical Chemistry International**, Madrid, v. 91, n. 1, p. 103-111, 2008.

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

FOYER, C. H. et al. Hydrogen peroxide-and glutathione associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. **Physiologia Plantarum**, Oxford, n. 10, p. 241-254, 1997.

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

FRUGOLI, J. A. et al. Catalase is encoded by a Multigene Family in *Arabidops thaliana* (L.) Heynh, **Plant Physiology**, Bethesda, v. 11, n. 2, p. 327-336, May 1996.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.

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

GUANAWARDENA, A. et al. Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localized form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L.) promoted by ethylene. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, n. 24, p. 1369-1375, 2001b.

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

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

HE, C. J.; MORGAN, P. W.; DREW, M. C. Transduction of ethylene signal required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation during hypoxia. **Plant Physiology**, Rockville, n. 112, p. 463-472, 1996b.

HERNANDEZ, M. et al. A rapeseed-specific gene, Acetyl-CoA carboxylase, can be used as a reference for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v. 49, p. 3622-3627, 2001.

HURST, C. D.; KNIGHT, A.; BRUCE, I. J. PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. **Molecular Breeding**, San Diego, v. 5, n. 6, p. 579-586, 1999.

INGHAM, D. J. et al. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants, **Biotech**, Rockville, v. 31, p. 132-141, 2001.

INOUE, M.; NEVINS, D. J. Changes in the autolytic activities of maize coleoptile cell walls during coleoptile growth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 38, n. 2, p. 161-167, Jan. 1997.

INSAUSTI, P. et al. Flooding induces a suite of adaptive plastic responses in the grass *Paspalum dilatatum*. **New Phytologist**, Hoboken, v. 152, p. 291-299, 2001.

JANG, J. Y. et al. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 54, p. 713-725, 2004.

JAT, R. L. et al. Effect of flooding and high soil water condition on root porosity and growth of maize. **Soil Science**, Raleigh, n. 23, p. 291-297, 1975.

JIANG, Y.; HUANG, B. Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 355, p. 341-349, Feb. 2001.

KAWASE, M. Effect of flooding on ethylene concentration in horticultural plants. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, San Diego, n. 97, p. 584-588, 1972.

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



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

LAMMERS, P. J. et al. The glyoxylate cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus. Carbon flux and gene expression. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 1287-1298, 2001.

LEMKE-KEYES, C. A.; SACHS, M. M. Genetics variation for seedling tolerance to anaerobic stress in maize germoplasm. **Maydica**, Bergamo, v. 34, p. 329-337, 1989.

LÉON, A. M. et al. Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 813-820, 2002.

LI, W.; HE, P.; JIN, J. **Potassium influenced phenylalanine ammonia-lyase, peroxidases and polyphenol oxidases in Fusarium graminearum infected maize (*Zea mays* L.)**. Davis: University of California, 2009.

LIVAK, K. J.; SCMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method. **Methods**, New York, v. 25, p. 402-408, 2001.

LIZASO, J. L.; MELENDEZ, L. M.; RAMIRES, R. Early flooding of two cultivars of tropical tropical maize. I shoot and root growth. **Journal of Plant Nutrients**, Madri, v. 24, p. 979-995, 2001.

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

LUO, M. et al. Characterization of gene expression profiles in developing kernels of maize (*Zea mays*) inbred Tex6. **Plants Breeding**, San Diego, v. 127, p. 569-578, May, 2008.

- LYNCH, J. P.; HO, M. D. Rhizoeconomics: carbon costs of phosphorus acquisition. **Plant and Soil**, Dordrecht, n. 269, p. 45-46, 2005.
- MACKAY, T. F. C. A maize in Diversity. **Science**, New York, v. 325, p. 688-689, Aug. 2009.
- MANO, Y. et al. Varietal difference and genetic analysis of adventitious root formation and the soil surface during flooding in maize and teosinte seedlings. **Crop Science**, Madison, n. 74, p. 41-46, 2005.
- MADHUSUDHAN, R. et al. Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells, **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 117, n. 4, p. 550-557, Apr. 2003.
- MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. Menlo Park: The Benjamin/Cummings, 1988. 560 p.
- MCDONALD, M. P.; GALWEY, N. W.; COLMER, T. D. Waterlogging tolerance in the tribe Triticeae: the adventitious roots of *Critasion marinum* have a relatively high porosity and a barrier to radial oxygen loss. **Plant Cell and Environment**, Oxford, n. 24, p. 585-598, 2001.
- MCPHERSON, D. C. Cortical air spaces in the roots of *Zea mays* L. **New Phytologist**, Cambridge, v. 38, p. 190-202, 1939.
- MEHLHORN, H. et al. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. **FEB Letters**, Amsterdam, v. 378, n. 3, p. 203-206, Jan. 1996.
- MITTLER, R. Oxidative stress antioxidants and stress tolerance. **Plant Science**, London, v. 5, n. 7, p. 406-410, 2002.

MITTLER, R. et al. Abiotic stress series reactive oxygen gene network of plants. **Plant Science**, London, v. 9, n. 10, p. 490-498, Oct, 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, n. 1, p.459-481, June, 2007.

MONK, L. S.; FAGERSTEDT, K. V.; CRAWFORD, R. M. M. Superoxide dismutase as an anaerobic polypeptide. A key factor recovery from oxygen deprivation in *Iris pseudacorus*? **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 4, p. 1010-1020, Dec. 1987.

MORITA, S. et al. cDNA encoding a rice catalase isozyme. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 10, p. 1015-1016, 1994.

NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signaling. **Curr Opin Plant Biololy**, Netherlands, v. 5, p. 388-395, 2002.

NEMOTO, S.; OTSUKA, M.; ARAKAWA, N. A positive correlation between catalase activity and ascorbate uptake in the tissues of guinea pigs and cultured cells of mammals. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 42, n. 5, p. 387-395, Oct. 1996.

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.

PANAUD, O. The molecular bases of cereal domestication and the history of rice. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 332, n. 2/3, p. 267-272, Feb./ Mar. 2009.

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

PATERNIANI, E. Métodos tradicionais de melhoramento de milho. In: BULL. L. T.; CANTARELLA, H. (Ed.). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade.** Piracicaba: Potafos, 1993. p. 22-43.

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

PEREIRA, F. J. et al. Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aerênquimas em raízes de milho “saracura”. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, p. 16-24, 2010.

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

PORTO, B. N. **Expressão de genes SOD e PG em milho BRS 4154 submetido a hipóxia na presença e ausência de cálcio.** 2010. 44 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, North-Holland, n. 339, p. 62-66, 2003.

RANERE, A. J. et al. The cultural and chronological context of early holocene maize and squash domestication in the Central Balsas River Valley, Mexico. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, n. 13, p. 5014-5021, Mar. 2009.

RICE-EVANS, C. A. et al. Aerenchyma develops by cell lysis in roots and cell separation in leaf petioles in *Sagittaria lancifolia* (Alismaceae). **Elsevier Science**, Amsterdam, v. 22, p. 291, 1991.

SAAB, I. N.; SACHS, M. M. A flooding-induced xyloglucan endo-transglycosylase homolog in maize is responsive to ethylene and associated with aerenchyma. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 1, p. 385-391, Sept. 1996.

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

SCHNABLE, P. S. et al. The B73 maize genome: complexity, diversity and dynamics. **Science**, New York, v. 326, n. 5956, p. 1112-1115, 2009.

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

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, May 2002.

SHOLDBERG, T. A. et al. Evaluating precision and accuracy when quantifying different endogenous control reference genes in maize using real-time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Stanford, v. 57, n. 7, Mar. 2009.

SILVA, A. R. Tolerância ao encharcamento. In: SIMPÓSIO SOBRE ALTERNATIVAS AO SISTEMA TRADICIONAL DE UTILIZAÇÃO DAS VÁRZEAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, n. 1., 1986. **Anais...** Brasília : PROVÁRZEAS/PROFIR, 1986. v. 1, p. 166-181.

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

SPOLEEN, S. G. et al. Spatial distribution of transcript changes in the maize primary root elongation zone at low water potential. **BMC Plant Biology**, California, v. 8, n. 32, Apr. 2008.

TAYLOR, N. G. Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 178, n. 2, p. 239-252, Apr. 2008.

TOSELLO, G. A. Milhos especiais e seu valor nutritivo. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. Piracicaba: Fundação Cargill, 1987. p. 375-409.

UZAROWSKA, A. et al. T. Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea mays* L.) by expression profiling. **BMC Plant Biology**, California, v. 15, n. 9, Feb. 2009.

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

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

XIA, X. J. et al. Reactive oxygen species are involved in Brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, p. 801-814, June 2009.

XING, Y.; JIA, W.; ZHANG, J. AtMEK 1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, Belgium, n. 58, p. 2969-2981, 2007.

YAN, B. et al. Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 179, n. 2, p. 261-268, Feb. 1996.

YANG, L.T. et al. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR. **Plant Cell Reports**, Cambridge, v. 23, p. 759–763, 2005.

YEN, C. H.; YANG, C. H. Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 39, p. 922-927, 1998.

YOKOYAMA, R.; ROSE, J. K. C.; NISHITANI, K. A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis, **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 1088-1099, 2004.

ZAIDI, P. H.; RAFIQUE, S.; SINGH, N. N. Response of maize (*Zea mays* L.) genotypes to excess soil moisture stress: morpho-physiological effects and basis of tolerance. **European Journal Agronomy**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 383-399, July 2003.

ZANANDREA, I. et al. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Journal of Botany**, Collingwood, v. 57, p. 661-669, 2009.

ZHANG, X. et al. Laser microdissection of narrow sheath mutant maize uncovers novel gene expression in the shoot apical meristem. **Plos Genetics**, Berkeley, v. 3. n. 6, 2007.