

# GENES INDUZIDOS POR TRATAMENTO COM CÁLCIO EM RAÍZES DO MILHO (*Zea mays* L.) SARACURA ‘BRS-4154’ EM CONDIÇÕES DE HIPOXIA

Anne Cybelle Pinto<sup>1</sup>, José Donizete Alves<sup>2</sup>, Newton Portilho Carneiro<sup>3</sup>, Eliane Aparecida Gomes<sup>4</sup>,  
Claudia Teixeira Guimarães<sup>3</sup>, Ubiraci Gomes de Paula Lana<sup>5</sup>, Sílvia Neto Jardim<sup>5</sup> e Antônio Álvaro  
Corsetti Purcino<sup>3</sup> ([corsetti@cnpmc.embrapa.br](mailto:corsetti@cnpmc.embrapa.br))

## Introdução

O alagamento e a submersão são fatores de estresses abióticos que afetam o desenvolvimento das plantas e, juntamente com a seca, salinidade e altas temperaturas constituem os principais determinantes para a distribuição das espécies vegetais no mundo (Visser et al., 2003). O alagamento provoca um ambiente hipóxico ou anóxico ao redor da raiz, que é o fator determinante dos seus efeitos adversos, uma vez que o oxigênio é o acceptor final de elétrons na rota de fosforilação oxidativa que gera ATP (Dennis et al., 2000). A anaerobiose resulta em alterações da expressão gênica em âmbito transcricional, traducional e pós-traducional (Sachs et al., 1980) e muitos desses sinais são ativados pela elevação intracelular do cálcio (Mckinsey et al., 2002). Quando o canal de cálcio é bloqueado, os genes induzidos por anoxia são reprimidos e a sobrevivência das plântulas e células em ambiente pós-anóxico fica comprometida (Subbaiah e Sachs, 2003). O milho ‘BRS-4154’ Saracura possui, como principal característica agrônômica, tolerância a períodos intermitentes de inundação do solo, e foi lançada no mercado pela Embrapa Milho e Sorgo, por ter apresentado ganhos significativos na produção de grãos, em condições de deficiência de oxigênio no solo (Parentoni et al., 1997). Como nenhum estudo na área molecular envolvendo esta variedade havia sido realizado, a estratégia desse trabalho foi utilizar hibridização subtrativa e PCR supressivo na identificação dos genes expressos sob influência do cálcio sob condições de alagamento.

## Material e Métodos

Sementes do ciclo 14 de seleção massal, sob alagamento intermitente do milho Saracura, foram germinadas e submetidas ao alagamento na presença ou não de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) a 0,75% (p/v). Para diminuir a pressão de oxigênio no tubo de germinação, tornando o ambiente hipóxico, fez-se borbulhamento com nitrogênio gasoso (3% v/v O<sub>2</sub> em N<sub>2</sub>) por 3 minutos (1 L.min<sup>-1</sup>) e os tubos foram hermeticamente vedados. Após dois dias de estresse, o ápice primário da raiz (5 mm) e o material restante desse órgão foram coletados, separadamente, armazenados em nitrogênio líquido e posteriormente estocados a -80°C. Os tratamentos foram ápice de raiz com cálcio, ápice de raiz sem cálcio, raiz com cálcio e raiz sem cálcio. Para a extração do RNA mensageiro, utilizou-se o “Kit Quickprep micro RNAm purification” (Amersham Biosciences), segundo as instruções do fabricante.

---

<sup>1</sup>Bolsista MS/CNPq/Universidade Federal de Lavras; <sup>2</sup>Professor/Universidade Federal de Lavras; <sup>3</sup>Pesquisador/Embrapa Milho e Sorgo; <sup>4</sup>Técnico de Nível Superior/ Embrapa Milho e Sorgo; <sup>5</sup>Estudante MS/Universidade Federal de Minas Gerais.

As bibliotecas de cDNA foram obtidas com o PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories) conforme instruções do fabricante. Os produtos da segunda amplificação por PCR, obtidos das reações de subtração direta, foram clonados no vetor PCR 2.1 TOPO, utilizando-se o “Kit TOPO TA Cloning for Sequencing” (Invitrogen). O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina e seqüenciado utilizando-se o “kit DYEnamic ET Dye Terminator” (Amersham Pharmacia). As seqüências foram processadas e comparadas com aquelas depositadas no banco de dados “Genbank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando-se o programa BlastX (Altschul et al., 1997). Para verificar a presença desses clones, o DNA total do milho Saracura foi extraído e digerido com enzimas de restrição e transferido para membrana de náilon, de acordo com metodologia de Southern (1975). As membranas foram hibridadas com sondas marcadas com fosfatase alcalina e reveladas em autoradiografias.

### Resultados e Discussão

Pela análise visual, observou-se que as plântulas submetidas a quatro dias de germinação, sob influência de cálcio, apresentaram redução acentuada no crescimento em relação às plântulas germinadas sem cálcio. As plântulas não apresentaram sinal de injúria neste período e sobreviveram a 48 h de estresse. Utilizando a técnica de hibridização subtrativa e PCR supressivo, foi possível a identificação de genes expressos diferencialmente sob hipoxia, influenciados pelo cálcio. Na biblioteca do ápice primário da raiz, destaca-se a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que é essencial na resposta anaeróbica da planta para reposição de ATP pela rota glicolítica (Tabela 1). Dentre os clones provenientes de raiz, 13 clones foram gerados (Tabela 2), sendo que 5 estão aparentemente relacionados a mecanismos fisiológicos de tolerância a estresses abióticos e a morte programada de células.

**Tabela 1-** Clones advindos da biblioteca de ápice radicular de milho Saracura, submetido a hipoxia com similaridade de seqüências no GenBank

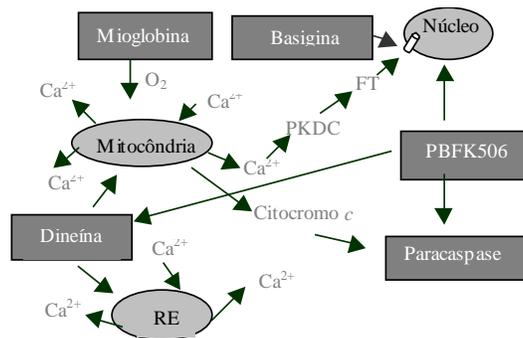
Clone	Descrição no banco de dados (GenBank)	<i>e-value</i>	Identidade	<i>Score</i>
A02	<i>Ixodes ricinus</i> glutathione S-transferase	3e-05	100%	56
B04	<i>Z. mays</i> gliceraldeído-3-P desidrogenase	0,0	99%	1013
C02	<i>Dianthus caryophyllus</i> provável proteína MtN3	2e-06	100%	60
D06	<i>Oryza sativa</i> cultivar japonica DNA	e-144	97%	517

**Tabela 2-** Clones advindos da biblioteca de raiz de milho Saracura, submetido a hipoxia com similaridade de seqüências no GenBank

Clone	Descrição no banco de dados (GenBank)	<i>e-value</i>	Identidade	<i>Score</i>
A03	<i>Homo sapiens</i> mioglobina	1e-35	97%	157
A11	<i>Zea mays</i> PCO096382 RNAm	2e-39	90%	168
B05	<i>H. sapiens</i> proteína-ligante FK506	3e-81	91%	309
C12	<i>H. sapiens</i> basigina	2e-57	99%	228
D11	<i>H. sapiens</i> paracaspase	0,0	99%	884
D12	<i>Z. mays</i> PCO078539 RNAm	e-173	95%	617
E04	<i>H. sapiens</i> dineína	e-120	99%	438
E10	<i>H. sapiens</i> basigina	1e-62	98%	246
E12	<i>Z. mays</i> PCO078539 RNAm	0,0	97%	728
F01	<i>H. sapiens</i> basigina	3e-69	100%	268
G11	<i>H. sapiens</i> paracaspase	0,0	98%	848
H02	<i>Z. mays parviglumis</i> seqüência DNA	1e-21	100%	109
H12	<i>H. sapiens</i> mioglobina	2e-39	98%	168

A mioglobina possui regiões muito similares à cadeia polipeptídica da hemoglobina, proteína de transporte de oxigênio (Dordas et al., 2003). Assim, a mioglobina provavelmente transporta oxigênio para a mitocôndria, uma vez que se trata de um ambiente de baixa pressão de oxigênio e, sob esta condição, não ocorre inibição total da respiração aeróbica. A dineína atua provavelmente ativando os canais de cálcio ou no recrutamento de organelas que acumulam cálcio, para locais que mais necessitam deste elemento (Thion et al., 1996). A paracaspase faz parte da rota de morte celular programada (Ameisen, 2002), promovendo, por exemplo, a formação de aerênquima que facilita a para difusão do oxigênio. A proteína-ligante FK506 é um possível receptor de hormônio que atua na transcrição de genes ou atua na via de transdução de sinal (Pérez-Pérez et al., 2004). Finalmente, a basigina é uma glicoproteína transmembrana que faz parte da constituição do complexo do poro nuclear (Yoshida et al., 2000). Este complexo permite a passagem de proteínas do citossol para o núcleo e vice-versa, atuando na transcrição de genes. Dentre os clones provenientes do ápice primário da raiz, destaca-se a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, proteína sintetizada na raiz durante condições anóxicas e conhecida como polipeptídeo anaeróbico (Manjunath & Sachs, 1997). Essa proteína é requerida para continuidade da glicólise, tornando-se essencial na resposta anaeróbica pela planta para reposição de ATP pela rota glicolítica. De alguma forma, todas as proteínas estão relacionadas e atuam na tentativa de promover uma maior sobrevivência da plântula sob condições de hipoxia, influenciado pelo cálcio. Além desses genes de função conhecida, alguns clones foram similares a genes sem função conhecida ou não tiveram similaridade com nenhuma seqüência

depositada no GenBank. Estes podem ser genes importantes que atuam na maior sobrevivência da planta ao estresse hipóxico influenciado pelo cálcio. Como alguns clones advindos da raiz do milho Saracura apresentaram identidade com genes humanos, a presença dos mesmos no genoma do milho foi confirmada por meio de “Southern-blot”. Para isso foram utilizados como sonda, cinco cDNAs provenientes de raiz, que apresentaram identidade com mioglobina, dineína, basigina, paracaspase e proteína ligante FK506. Como controle positivo, utilizou-se a sonda gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do milho, presente no material proveniente do ápice radicular. A Figura 1 mostra a provável relação entre as proteínas encontradas na biblioteca de raiz de plântulas de milho submetidas a hipóxia sob a influência do cálcio.



**Figura 1.** Representação da provável relação entre as proteínas codificadas pelos genes advindos da biblioteca subtrativa das raízes de plântulas de milho submetidas a hipóxia sob influência do cálcio.

### Conclusões

Uma vez confirmada a superexpressão desses genes sob as condições de alagamento, maiores conclusões poderão ser inferidas sobre o efeito do cálcio nos mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na tolerância a esse estresse. Além do que esses genes poderão ser transferidos para outras linhagens elites de milho e incorporadas nos programas de melhoramento genético.

### Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMEISEN, J. C. Origin and evolution of programmed cell death. **Cell Death Differentiation**, London, v. 9, n. 4, p. 367-393, 2002.
- DENNIS, E. S.; DOLFERUS, R.; RAHMAN, M.; Wu, Y.; HOEREN, F. U.; GROVER, A.; ISMOND, K. P.; GOOD, A. G.; PEACOCK, W. J. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 342, p. 1-15, 2000.
- DORDAS, C.; RIVOAL, J.; HILL, R. D. Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 1, p. 173-178, 2003.

MANJUNATH, S.; SACHS, M. M. Molecular characterization and promoter analysis of maize cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 33, n. 1, p. 97-112, 1997.

MCKINSEY, T. A.; ZHANG, C. L.; OLSON, E. N. MEF2: A calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 27, n. 5, p. 40-47, 2002.

PARENTONI, S. N.; GAMA, E. E.; LOPES, M. A.; SANTOS, M. X.; GUIMARÃES, P. E. O.; PACHECO, C. A.; SOUZA, I. R. P.; MEIRELES, W.; CORREA, L. A. Seleção para tolerância ao encharcamento na variedade de milho CMS54-Saracura. In: REUNIÃO DE MELHORISTAS DE MILHO NA AMÉRICA LATINA, 1997, Colômbia. **Anais...** Colômbia, 1997.

PÉREZ-PÉREZ, J. M.; PONCE, M. R.; MICOL, J. L. The *ULTRACURVATA2* gene of *Arabidopsis* encodes a FK506-binding protein involved in auxin and brassinosteroid signaling. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 134, n. 1, p. 101-117, 2004.

SACHS, M. M.; FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic proteins of maize. **Cell**, Cambridge, v. 20, n. 3, p. 761-767, 1980.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, n. 3, p. 503-517, 1975.

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

THION, L.; MAZARS, C.; THULEAU, P.; GRAZIANA, A.; ROSSIGNOL, M.; MOREAU, M.; RANJEVA, R. Activation of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels by disruption of microtubules in carrot cells. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 393, n. 1, p. 13-18, 1996.

VISSER, E. J. W.; VOESENEK, L. A. C. J.; VARTAPETIAN, B. B.; JACKSON, M. B. Flooding and Plant Growth. **Annals of Botany**, London, v. 91, p. 107-109, 2003. Supplement

YOSHIDA, S.; SHIBATA, M.; YAMAMOTO, S.; HAGIHARA, M.; ASAI, N.; TAKAHASHI, M.; MIZUTANI, S.; MURAMATSU, T.; KADOMATSU, K. Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain. **Europe Journal Biochemistry**, Oxford, v. 267, n. 14, p. 4372-4380, 2000.