

**Genes Induzidos por Tratamento com Cálcio em Raízes do Milho  
(Zea mays L.)  
Saracura 'BES-4154', em Condições de Hipoxia**

[Previous](#) [Top](#)  
[Next](#)



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C

ANNE C. PINTO<sup>(1\*)</sup>, JOSÉ D. ALVES<sup>(1)</sup>, NEWTON, P. CARNEIRO<sup>(2)</sup>, ELIANE A. GOMES<sup>(2)</sup>, CLAUDIA T. GUIMARÃES<sup>(2)</sup> UBIRACI G. P. LANA<sup>(2)</sup>, SILVIA N. JARDIM<sup>(2)</sup> e ANTÔNIO A. C. PURCINO<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal de Lavras, CP 37, CEP 37200-000, Lavras, MG

<sup>(\*)</sup>anecybele@yahoo.com.br <sup>(2)</sup> Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG

### **Introdução**

O alagamento e a submersão são fatores de estresses abióticos que afetam a vegetação e, juntamente com a seca, salinidade e altas temperaturas constituem os principais determinantes da distribuição das espécies vegetais no mundo (Visser et al., 2003). Essa situação provoca um ambiente hipóxico ou anóxico ao redor da raiz, que é o principal fator determinante dos efeitos adversos do alagamento, uma vez o oxigênio é oceptor final de elétrons na rota de fosforilação oxidativa que gera ATP (Dennis et al., 2000). As mitocôndrias sofrem com a deficiência de oxigênio antes de qualquer outra organela. Experimentos realizados por Subbaiah et al. (1998), com cultura de células em suspensão de milho transferidas de um meio aeróbico para outro anaeróbico, demonstraram que os íons cálcio liberados da mitocôndria para o citossol participam na sinalização da diminuição do oxigênio, levando à expressão de genes relacionados com a anaerobiose. A anaerobiose resulta em alterações da expressão gênica em âmbito transcricional, traducional e pós-traducional (Sachs et al., 1980). A união dos sinais citoplasmáticos para a ativação e repressão de genes no núcleo direciona a célula para a divisão, diferenciação ou morte. Muitos desses sinais na rota de transdução de sinal 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). Vários trabalhos já foram realizados com o milho 'BRS-4154' Saracura buscando avaliar sua tolerância a hipoxia e a influência do cálcio no aumento dessa sobrevivência. Essa variedade 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 aumentos em alguns parâmetros, relacionados com a produção, em condições de deficiência de oxigênio no solo (Parentoni et al., 1997). Nenhum estudo na área molecular envolvendo esta variedade foi feito e, por isso, o interesse em se trabalhar nesta área com esta cultivar. A estratégia utilizada para a obtenção de genes relacionados à tolerância ao alagamento influenciado pelo cálcio foi a técnica de hibridação subtrativa e

PCR supressivo.

### **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 ( $\text{CaCl}_2$ ) 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  $\text{O}_2$  em  $\text{N}_2$ ) por 3 minutos ( $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 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  $-80^\circ\text{C}$ . Os tratamentos foram ápice de raiz com cálcio, ápice de raiz sem cálcio, raiz com cálcio e raiz sem cálcio. Para a extração do RNAm, utilizou-se o "Kit Quickprep micro RNAm purification" (Amersham Biosciences), segundo as instruções do fabricante. Para a obtenção das bibliotecas de cDNA, foi utilizado 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<sup>R</sup> 2.1 TOPO, utilizando-se o "Kit TOPO TA Cloning for Sequencing" (Invitrogen). Para a extração dos plasmídeos, foi utilizado o método de lise alcalina descrito por Sambrook et al. (1989). Esses plasmídeos foram seqüenciados utilizando-se o "kit DYEnamic ET Dye Terminator" (Amersham Pharmacia), 3,2  $\mu\text{M}$  de "primer" pUC/M13 direto ou reverso, separadamente. As seqüências foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados "Genbank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando-se o programa Blast N (Altschul et al., 1997). Para verificar a expressão desses clones, foi feita a extração de DNA de folhas do milho Saracura segundo metodologia desenvolvida por Saghai-Marroof et al. (1984). Esse DNA foi 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.

### **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 hibridação subtrativa e PCR supressivo, 4 clones (Tabela 1) representando fragmentos de genes induzidos por hipoxia sob influência do cálcio proveniente do ápice da raiz e 13 clones (Tabela 2) da biblioteca de raiz do milho Saracura foram gerados. A técnica de hibridação subtrativa por supressão detectou genes expressos diferencialmente sob hipoxia, influenciados pelo cálcio. A Figura 1 mostra a provável relação entre as proteínas encontradas na biblioteca de raiz de plântulas de milho submetidas a hipoxia sob a influência de cálcio. Dentre as proteínas identificadas na raiz, pode-se citar a mioglobina, cuja cadeia polipeptídica tem regiões muito similares às cadeias da hemoglobina, proteína de transporte de oxigênio (Dordas et al., 2003). 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, que provavelmente ativa os canais de cálcio ou atua 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

a formação de aerênquima, que facilita a difusão do oxigênio. A proteína-ligante FK506, que pode ser um receptor de hormônio que atua na transcrição de genes ou atua na via de transdução de sinal (Pérez-Pérez et al., 2004) e, finalmente, a basigina, que 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 e 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. Além desses, genes do projeto de mapeamento do genoma de milho que, apesar da função não revelada ainda, podem ser genes importantes que atuam na maior sobrevivência da planta ao estresse hipóxico influenciado pelo cálcio. De alguma forma, todas as proteínas estão relacionadas e atuam na tentativa de promover uma maior sobrevivência para a plântula em hipoxia sob influência do cálcio. Esses genes poderão ser transferidos para outras variedades de milho de interesse econômico, por meio de transformação. Como algumas seqüências dos genes de raiz do milho Saracura apresentaram identidade com genes de *Homo sapiens*, foi feita uma análise, utilizando-se da metodologia de "Southern-blot", para a confirmação da presença desses genes no milho Saracura. Foram escolhidos cinco cDNAs, como sonda, 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 da raiz. Pelo sinal positivo apresentado pela hibridação das sondas, foi possível confirmar a presença destas seqüências no milho Saracura (Figura 2).

#### **Literatura citada**

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, Apr. 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, Jan. 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, Jan. 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, Jan. 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, May 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, Jan. 2004.

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

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, M. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, n. 24, p. 8014-8018, Dec. 1984.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold spring harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

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.

SUBBAIAH, C. C.; BUSH, D. S.; SACHS, M. M. Mitochondrial contribution to the anoxic Ca<sup>2+</sup> signal in maize suspension-cultured cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 118, n. 3, p. 759-771, Nov. 1998.

SUBBAIAH, 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, Jan. 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, Sept. 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, Jan. 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

Tabela 1: Resultados encontrados no banco de dados (GenBank) referentes à biblioteca de ápice de raiz do milho Saracura, submetido a hipóxia

Clone	Descrição no banco de dados (GenBank)	e-value	Identidade	Score
A02	<i>Inositol ricinosa</i> glutatona S-transferase	3e-05	100%	56
E04	<i>Z. mays</i> gliceraldeído-3-P desidrogenase	0,0	99%	1013
C02	<i>Dianthus caryophyllus</i> provável proteína MIN3	2e-06	100%	60
D06	<i>Oryza sativa</i> cultivar japonesa DNA	e-144	97%	517

TABELA 2: Resultados encontrados no banco de dados (GenBank) referente: biblioteca de raiz do milho Saracura, submetida a hipóxia

Clone	Descrição no banco de dados (GenBank)	e-value	Identidade	Score
A03	<i>Homo sapiens</i> mioglobina	1e-35	97%	137
A11	<i>Zea mays</i> PCC096382 RNAm	2e-39	90%	168
B05	<i>H. sapiens</i> proteína-ligante FK506	3e-81	91%	309
C12	<i>H. sapiens</i> bangina	2e-57	99%	228
D11	<i>H. sapiens</i> paracaspase	0,0	99%	334
D12	<i>Z. mays</i> PCC078539 RNAm	e-173	95%	617
E04	<i>H. sapiens</i> disetina	e-120	99%	438
E10	<i>H. sapiens</i> bangina	1e-62	98%	246
E12	<i>Z. mays</i> PCC078539 RNAm	0,0	97%	728
F01	<i>H. sapiens</i> bangina	3e-69	100%	268
G11	<i>H. sapiens</i> paracaspase	0,0	98%	348
H02	<i>Z. mays parviglans</i> sequência DNA	1e-21	100%	109
H12	<i>H. sapiens</i> mioglobina	2e-39	98%	168

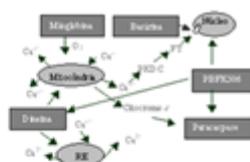


FIGURA 1. Representação da provável relação entre as proteínas codificadas pelos fragmentos dos genes obtidos na biblioteca subtrativa por supressão das raízes de plântulas de milho submetidas a hipóxia sob influência do cálcio

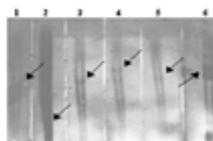


FIGURA 2. Resultado da hibridação dos clones com o DNA genômico do milho Saracura: 1: mioglobina, 2: proteína-ligante FK506, 3: disetina, 4: bangina, 5: paracaspase, 6: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. As setas indicam as bandas híbridadas pela sonda

