

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

ANNE CYBELLE PINTO

2004

ANNE CYBELLE PINTO

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

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

Orientador
Prof. Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

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

Pinto, Anne Cybelle

Genes induzidos por tratamento com cálcio em raízes do milho (*Zea mays* L.) Saracura 'BRS - 4154', em condições de hipoxia / Anne Cybelle Pinto. -- Lavras : UFLA, 2004.

61 p. : il.

Orientador: José Donizeti Alves.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Milho Saracura 'BRS-4154'. 2. Hipoxia. 3. Cálcio. 4. Hibridação Subtrativa. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-
633.1523

ANNE CYBELLE PINTO


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

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

APROVADA em 26 de março de 2004.

Dr. Antônio Álvaro Corsetti Purcino EMBRAPA Milho e Sorgo

Dr. Marcelo Murad Magalhães UFLA


Prof. Dr. José Donizeti Alves
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

DEDICO

Aos meus pais Mauro Lúcio Pinto (in memorian) e Maria Auxiliadora Pinto, pelo apoio constante, incentivo, carinho, atenção e por fazer parte de todas as minhas conquistas.

Amo vocês, obrigada por tudo.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	i
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Local	11
3.2 Germinação e hipoxia	11
3.3 Extração do RNA mensageiro (RNAm)	12
3.4 Precipitação do RNAm	12
3.5 Identificação dos genes diferencialmente induzidos por tratamento com cálcio	14
3.6 Síntese dos cDNAs testes e controles	14
3.7 Digestão dos cDNAs com enzima de restrição <i>Rsa</i> I	18
3.8 Ligação dos adaptadores ao cDNA teste digerido com <i>Rsa</i> I	19
3.9 Hibridações	19
3.10 Amplificação por PCR	20
3.11 Preparo das células competentes de <i>E. coli</i> (DH5 α)	22
3.12 Preparação dos plasmídeos para digestão e ligação dos insertos	23
3.13 Digestão dos clones	25
3.14 Reação de seqüenciamento dos clones	25
3.15 Análise dos clones	26
3.16 Análise de Southern Blot	26
4 Resultados e Discussão	32
4.1 Influência do cálcio na germinação e na sobrevivência das plântulas submetidas a hipoxia	32

4.2 Eficiência da subtração	33
4.3 Análise por Southern blot	50
5.0 Conclusão	53
Referências Bibliográficas	54

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, por todos os dias iluminar meus passos.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade concedida de realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À minha mãe, Maria Auxiliadora, por sempre me apoiar, por acreditar em mim, pela presença constante e ajuda incansável.

As minhas irmãs, Ariadna e Milene, pelo apoio e incentivo.

À minha vovó Dodora, pelo apoio de sempre e pelo carinho.

Ao prof. Dr. José Donizetti Alves, pela orientação, pela confiança, pelos ensinamentos transmitidos e por permitir a realização de mais este sonho.

Ao Dr. Marcelo Murad Magalhães, pela amizade, pelos ensinamentos, pela disponibilidade constante e co-orientação.

Aos professores Luiz Edson, Amauri, Ângela e Renato, obrigada pelos ensinamentos e por enriquecerem meus conhecimentos.

À Embrapa Milho e Sorgo, pela oportunidade e por permitir a realização de todas as atividades práticas.

Ao Dr. Antônio Álvaro Corsetti Purcino, pela grande oportunidade, pelo incentivo e apoio. Obrigada pela co-orientação e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Newton, pelas sugestões e pelos ensinamentos.

À Edna que, com todo seu profissionalismo e amizade contribuiu para realização das atividades laboratoriais.

À Dra. Eliane (Lili), “minha conselheira I”, pela amizade, incentivo, pelas críticas, ensinamentos, por todas as sugestões para a finalização deste trabalho e pela acolhida (adorei a convivência). Obrigada pela paciência.

À Sílvia Jardim, “minha conselheira II”, pela amizade, sugestões, ensinamentos, pela importante e grande contribuição nas etapas finais.

Ao Ubiraci, pela amizade e disponibilidade constante para realização das atividades laboratoriais. Obrigada pelas sugestões, pelo apoio, pelos ensinamentos, pelo incentivo...

A todos os funcionários e amigos da Embrapa, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos colegas de turma, Ednabel, Sílvia, Rairys, Patrícia (garrafinha), Cláudia, Érico, Daniela Duarte, Morbeck (gigante), Inês, Marco Antônio Alencar, Giandrê, Grécia, Andréa, Peterson, Tereza, Cristiano e Márcio (miudinho), pela convivência e amizade.

Em especial ao Érico, “meu irmão”, pela amizade e por estar sempre disposto e pronto a ajudar.

Aos colegas que me ajudaram na germinação e alagamento, Dani Fries, Marcelo, Tanhan, Carlos Vinício (Espeto), Renata, Érico, Morbeck, Ednabel, Guto, Marcus José, Inês e Marilza. Valeu!

À Daniela Duarte, pela amizade, sugestões, pelos momentos de descontração. Adorei a convivência (sentirei saudades da nossa “república”).

Aos funcionários e amigos Lena, Tanhan, Odorêncio, Evaristo, Joel e Izonel, pela convivência harmoniosa.

À Lena e Tanhan, por adotarem o “Projeto Fome Zero”, ao servirem as deliciosas pipocas, chás e cafezinhos nos momentos de apuro.

Aos amigos em especial, Gustavo, Érico, Sílvia Martim, Ednabel, Leonardo, Lúcia, Cíntia, Patrícia, Marcus José, Dani Duarte, Morbeck e Dani Fries. Adorei a convivência.

Aos colegas da Fisiologia, Alessandro (prof. “Heleno”), Soami, Rupert, João Paulo, Marco Antônio, Lisandro, Hyrandir, Lenaldo, Lílian, Cristina,

Breno, Paulo Cairo, Geórgia, Karina, Marilza, Breno e Rodrigo, pela agradável convivência.

OBRIGADA!!!!!!!

No mais...

É APG!!! É APG!!!

RESUMO

PINTO, Anne Cybelle. Genes induzidos por tratamento com cálcio em raízes do milho (*Zea mays* L.) Saracura 'BRS-4154', em condições de hipoxia. 2004. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Estudos em condições de alagamento envolvendo o milho Saracura 'BRS-4154' têm sido realizados a fim de compreender melhor o mecanismo de tolerância a esse estresse abiótico. Neste trabalho, duas bibliotecas de cDNA subtraído da variedade de milho (*Zea mays* L.) Saracura – 'BRS-4154', sob condições de alagamento influenciados pelo cálcio, foram construídas, utilizando-se do método de hibridação subtrativa por supressão. Em uma biblioteca, o RNAm isolado das raízes de plântulas de milho germinadas e alagadas sob influência do cálcio foi utilizado como população "teste", e raízes de plântulas germinadas e alagadas sem influência do cálcio foram utilizadas como população "controle". Na outra biblioteca a população "teste" foi construída com base no material proveniente do ápice de raiz de plântulas de milho germinadas e alagadas sob influência do cálcio e a população "controle" foi proveniente do RNAm isolado de ápice de raiz germinados e alagados sem influência do cálcio. Vinte e seis clones de raiz foram analisados no GenBank e cinco estão envolvidos na resposta da planta à hipoxia influenciados pelo cálcio. Dos sete clones de ápice analisados, um está envolvido na resposta da planta sob hipoxia influenciada pelo cálcio, o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gpc4). Análise de Southern blot revelou que os seis clones que foram induzidos pelo cálcio na condição do estresse estabelecido estão presentes no milho Saracura. Isto indica que a hibridação subtrativa por supressão pode ser utilizada na clonagem de cDNAs expressos diferencialmente sob estresse hipóxico e os seis genes possivelmente estão envolvidos no mecanismo de tolerância ao alagamento.

¹ Comitê Orientador: José Donizeti Alves - UFLA (Orientador), Antônio Álvaro Corsetti Purcino - Embrapa Milho e Sorgo (Co-orientador), Marcelo Murad Magalhães – UFLA.

ABSTRACT

PINTO, Anne Cybelle. Genes induced by treatment with calcium in Saracura 'BRS-4154' maize (*Zea mays L.*) roots in hypoxia conditions. 2004. 61 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Studies in flooding conditions involving Saracura 'BRS-4154' were made in order to understand better the tolerance mechanism to this abiotic stress. In this research, two subtracted cDNA libraries from maize (*Zea mays L.*) Saracura variety, under flooding conditions influenced by calcium, were made, using suppression hybridization subtractive method. In one library, the mRNA isolated from germinated and flooded maize plantlets under calcium influence was used as population control. In other library the test population was constructed based in material provement from germinated and flooded maize apex root under calcium influence and the control population was obtained from mRNA isolated in flooded and germinated root apex without calcium influence. Twenty six clones from root were analyzed in GenBank and five were involved in plant response to hypoxia influenced by calcium. Considering the seven clones from apex, one is involved in plant response under hypoxia influenced by calcium being glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase (*gpc4*). Southern blot analysis revealed that six clones that were induced by calcium in stress condition set are present in Saracura maize. These results indicate that subtractive hybridization by suppression could be used in cloning of cDNA differentially expressed under hypoxic stress and the six genes possibly were involved in mechanism of flooding tolerance.

¹ Guidance Committee: José Donizeti Alves - UFLA (Adviser), Antônio Álvaro Corsetti Purcino - Embrapa Milho e Sorgo (Co-adviser), Marcelo Murad Magalhães – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A deficiência de oxigênio no solo, causada pelo excesso de água, é um dos fatores determinantes da redução da produtividade das mais variadas espécies de plantas. Sob essas condições, a respiração aeróbica das plantas e microrganismos reduz rapidamente a concentração do oxigênio na solução do solo, levando à formação de um ambiente hipóxico (baixa pressão de oxigênio) ou anóxico (ausência de oxigênio), culminando com o desaparecimento das plantas sensíveis. Apesar do estresse, existem espécies de plantas, como o arroz, por exemplo, que conseguem sobreviver ao alagamento, devido a adaptações anatômicas, que permitem a difusão interna do oxigênio atmosférico para as raízes submersas e, mesmo, adaptações metabólicas, prolongando a sobrevivência da espécie. Porém, plantas sensíveis a estas condições têm os crescimentos vegetativo e reprodutivo reduzidos, de forma que a permanência prolongada sob deficiência de oxigênio pode levá-las à morte.

A sensibilidade do milho (*Zea mays* L.) em solos com períodos intermitentes de excesso de água levou os pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, a lançarem no mercado, em 1997, a variedade 'BRS-4154', conhecida como milho Saracura. Esse trabalho de melhoramento foi direcionado para a seleção de plantas com capacidade para suportar períodos temporários de alagamento do solo, característica que as cultivares de milho disponíveis no mercado normalmente não tem e, após quatorze ciclos de seleção massal sob condições de umidade do solo, esta variedade se revelou tolerante a períodos intermitentes de alagamento.

Com o intuito de elucidar como esta variedade se adapta a ambientes alagados, o Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, em parceria com a Embrapa Milho e Sorgo, vem desenvolvendo trabalhos para

caracterizar os mecanismos envolvidos na tolerância desta variedade ao déficit de oxigênio. Estes trabalhos permitiram observar que o fornecimento de cálcio exógeno aumenta ainda mais a sobrevivência, retardando a morte das plantas, porém, reduzindo o crescimento das mesmas.

Baseado em alguns aspectos fisiológicos já conhecidos desta cultivar e devido à escassez de pesquisas moleculares, este trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar genes com expressão induzida pelo alagamento sob influência do cálcio, no ápice da raiz primária e no restante dessa raiz da variedade do milho Saracura, utilizando a técnica de hibridação subtrativa e PCR por supressão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

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. O sucesso ou o fracasso da produção pode ser também determinado pela frequência ou extensão do alagamento (Visser et al., 2003).

O alagamento e a submersão levam à redução de trocas gasosas entre o tecido da planta e a atmosfera porque a difusão dos gases, em particular o oxigênio, é 10.000 vezes mais lenta na água do que no ar (Armstrong, 1979). Esta situação provoca um ambiente hipóxico ou anóxico ao redor da raiz, que é o principal fator determinante dos efeitos adversos do alagamento, uma vez que as plantas superiores são essencialmente organismos aeróbicos. O oxigênio é vital para a rota que fornece energia às células, sendo o acceptor final de elétrons na rota de fosforilação oxidativa, que gera ATP, primeira fonte de energia para o metabolismo celular (Dennis et al., 2000).

As mitocôndrias são consumidoras primárias de oxigênio e são as principais fontes de energia dos organismos aeróbicos. Conseqüentemente, sofrem com a deficiência de oxigênio antes de qualquer outra organela. As mitocôndrias podem também ter outro papel chave. 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 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, que controlam esse direcionamento celular, são ativados pela elevação intracelular do cálcio (Mckinsey et al, 2002). Uma região da raiz que, provavelmente, requer altas taxas de absorção do cálcio, devido ao processo de crescimento e desenvolvimento, é o ápice (Kiegle et al, 2000). Nesta região, a atividade metabólica é a primeira a ser afetada pela anoxia, provocando sua morte antes do restante da raiz primária que ainda é capaz de recuperar e sobreviver (Vantoi et al., 1995). O fornecimento de açúcar exógeno pode melhorar o metabolismo de energia e aumentar a sobrevivência (Webb e Armstrong, 1983), bem como restaurar a estrutura da mitocôndria em espécies sensíveis e tolerantes a anoxia (Vartapetian et al., 2003). Outras estratégias também são utilizadas buscando aumentar a sobrevivência à anoxia, como as aplicações de hormônios (Ellis et al., 1999) e cálcio (Vitorino et al., 2001).

O papel principal dos canais permeáveis ao cálcio na membrana plasmática, além de contribuir para a absorção deste elemento necessário para a nutrição da planta, parece ser o de sinalização celular (Miedema et al., 2001). Estes canais são encontrados em todas as membranas das plantas e classificados, de acordo com a dependência de voltagem, como canais de cálcio ativados pela despolarização, ativados pela hiperpolarização ou canais de cálcio independente da voltagem (Sanders et al., 2002).

A organização do citoesqueleto pode contribuir para regular a atividade do canal de cálcio na transdução de sinal dependente de Ca^{2+} em plantas superiores. Há fortes indícios sugerindo que os microtúbulos estejam envolvidos na mediação da transdução de estímulos externos, tais como temperatura, ataques por insetos, injúrias, feridas e substâncias de crescimento, onde o cálcio está envolvido como mensageiro secundário. O potencial de membrana controla a associação do microtúbulo com a membrana plasmática. Quando isso ocorre, por mecanismos desconhecidos, o canal de cálcio dependente da voltagem é

inibido e o rompimento dos microtúbulos ou de outro componente do citoesqueleto leva a um aumento da atividade desses canais. No entanto, a estabilidade dos microtúbulos não exerce qualquer efeito no canal (Thion et al., 1996).

Em plantas, dois sistemas de transporte ativo ajudam a controlar a concentração de cálcio na célula: a bomba Ca^{2+} -ATPase, que apresenta alta afinidade com o cálcio e o co-transporte do tipo antiporte, que apresenta baixa afinidade ao cálcio (Palmgren e Harper, 1999). Os transportadores de efluxo do cálcio (que removem o Ca^{2+} do citoplasma) exercem um papel importante tanto quanto os transportadores de influxo (transportadores que permitem a entrada do Ca^{2+} para o citoplasma ou organelas) na sinalização do cálcio. Os transportadores de alta afinidade, Ca^{2+} -ATPase, atenuam e modulam o estímulo induzido pela elevação do cálcio. Juntamente com os transportadores de influxo, a bomba de cálcio não somente coordena os estímulos específicos para os sinais de Ca^{2+} , mas os regulam e propagam (Camacho e Lechleiter, 1993).

Diversas evidências indicam que mudanças do cálcio citossólico, induzidas pela anoxia, ocorrem próximo à mitocôndria e distante do vacúolo. Outras organelas, como retículo endoplasmático, parecem contribuir para a entrada do cálcio no citossol, mas o vacúolo, organela que contém maior concentração de cálcio, parece não exercer papel na elevação do cálcio citossólico em condições de anoxia (Subbaiah et al., 1998). A mudança do cálcio citossólico induzida pela anoxia inicia-se em áreas ricas em mitocôndrias (Rutter et al., 1996), como as localizadas ao redor do núcleo ou adjacente à membrana plasmática (Subbaiah et al., 1994).

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. Sob condições de déficit de energia, o tráfego desregulado de íons pode levar a uma contínua elevação de cálcio ou declínio de

fotossíntese é interrompido (Drew et al., 2000). A formação de aerênquima ao aumentar a porosidade facilita a difusão do oxigênio da parte da planta exposta ao ar para partes que estejam submersas. Esta estrutura presente em folhas, pecíolos, caules e raízes, surge por separação (esquizogenia) ou por lise de células (lisigenia) (Schussler e Longstreth, 1996). Estudos indicam que a formação de aerênquima, do tipo lisígeno, ocorre por morte celular programada (Drew et al., 2000). O fornecimento exógeno de cálcio prolongou a sobrevivência de duas variedades de milho, Saracura e 'BR-107', ao alagamento (Vitorino et al., 2001), ao mesmo tempo em que reduziu a formação de aerênquima e atuou na integridade da parede celular, o que dificultou o acesso de enzimas de degradação que o próprio cálcio ativa (Dantas et al., 2001). Além da formação de aerênquimas, a hipertrofia do caule e a formação de raízes adventícias foram importantes respostas adaptativas ao alagamento (Vantoi et al., 1995).


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). Comparando essa variedade com uma não tolerante, 'BR-107', Vitorino et al. (2001) relataram que a 'BRS-4154' mostrou-se superior quanto à tolerância ao alagamento. Segundo esses estudos, após o quarto dia de hipoxia, as plantas da BR-107 mostraram sensibilidade à deficiência de oxigênio no meio, apresentando taxa de sobrevivência próxima de zero, enquanto que a sobrevivência do Saracura foi em torno de 73%.

subtrativa e PCR supressivo, que já vem sendo utilizada com sucesso no Laboratório de Biologia Molecular, do Núcleo de Biologia Aplicada, da Embrapa Milho e Sorgo, na obtenção de genes relacionados à tolerância ao alumínio. Nesse trabalho, as referidas técnicas apresentaram uma alta sensibilidade, alta eficiência e baixo aparecimento de falso positivo, o que reduz o número de “screening de seleção” das bibliotecas genômicas.

A hibridação subtrativa é uma técnica que permite comparar duas populações de RNA mensageiro (RNAm) e obter clones de genes que são expressos em uma população e ausentes na outra. Embora existam vários métodos semelhantes, a teoria básica da subtração é simples. Primeiro, ambas as populações de RNAm são convertidas em cDNA: refere-se ao cDNA que contém a cópia específica (expresso diferencialmente) como “teste” e o cDNA de referência como “controle”. Os cDNAs “teste” e “controle” são hibridados e as seqüências hibridadas são então suprimidas por PCR supressivo. Conseqüentemente, as seqüências não hibridadas de cDNAs representam os genes que são expressos na população “teste”, mas são ausentes na população “controle”. A técnica de hibridação subtrativa é o único método baseado na amplificação seletiva de seqüências expressas diferencialmente que supera as limitações técnicas dos métodos tradicionais de subtração (Diatchenko et al., 1996; Gurskaya et al., 1996).

Estudando o comportamento de plântulas de milho Saracura a hipoxia, Vitorino et al. (2001) relacionaram a diminuição de sobrevivência ao alagamento à intensa lise celular ocorrida na região do mesocótilo. Essa região tornava-se translúcida e flácida com o prolongamento do estresse, formando uma forte constrição, responsável pelo tombamento e morte das plântulas. Entretanto, ao analisar a influência do cálcio, verificou-se que a presença desse elemento na germinação promoveu um aumento na sobrevivência da plântula. Em seu trabalho, Gouvêa (2001) constatou que a presença do cálcio no tampão de alagamento diminuiu o número de plântulas com sintomas de degradação da parede celular devido ao seu papel na manutenção da estabilidade da parede. Esse resultado foi confirmado por Fries (2003), que pôde observar que os sintomas de região translúcida e constrição diminuíram ou desapareceram nas plântulas de quatro dias germinadas e/ou alagadas em presença do cálcio. Fries (2003) observou também que, na ausência total do cálcio, a tolerância do milho Saracura a hipoxia diminuiu drasticamente com o aumento da idade. Quando o cálcio estava presente somente no tampão de alagamento ou somente no papel de germinação, a diferença na sobrevivência entre as plântulas com dois e quatro dias de germinação diminuiu acentuadamente. Quando o cálcio esteve presente em ambas as situações, não houve diferença na sobrevivência entre as plântulas com dois e quatro dias. Quando as plântulas são germinadas com solução de cloreto de cálcio, as reservas ficam preservadas na cariópse, comprometendo o crescimento das plântulas durante aquele período. Porém, uma vez alagadas, elas passam a alocar e utilizar as reservas preservadas para a manutenção de seu metabolismo, conferindo maior tolerância (Purcino, 2001).

Até o momento, nenhum estudo na área molecular envolvendo o milho Saracura foi feito e, por isso, o interesse em se trabalhar nesta área com esta variedade. A estratégia utilizada para a obtenção de genes relacionados à tolerância ao alagamento influenciado pelo cálcio foi a técnica de hibridação



extração do RNAm. Os tratamentos foram ápice de raiz com cálcio, ápice de raiz sem cálcio, raiz com cálcio e raiz sem cálcio.

3.3 Extração do RNA mensageiro (RNAm)

O RNAm para produção das bibliotecas de cDNA foi extraído dos ápices de raízes e das raízes, separadamente, das plantas de milho Saracura cultivadas sob condições de alagamento na presença e ausência de solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v). Para a extração do RNAm, utilizou-se o “Kit Quickprep micro RNAm purification” (Amersham Biosciences, Piscataway, EUA), segundo as instruções do fabricante. Por meio desse kit foi possível realizar a extração do RNAm a partir de células eucarióticas sem a necessidade de purificar o RNA total. O fluxograma de extração de RNAm está descrito na Figura 1.

3.4 Precipitação do RNAm

Ao eluído de RNAm (~ 400 μ L), adicionaram-se 10 μ L de solução de glicogênio e 40 μ L de solução de acetato de potássio 2,5 M, pH 5,0. Acrescentou-se 1 mL de etanol 95% (v/v) gelado (-20°C) e incubou-se por 30 minutos a -20°C. Centrifugou-se por 5 minutos, a 16.000 g, a 4°C; descartou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado na centrífuga a vácuo por 5 minutos. O RNAm foi ressuspensão em 10 μ L de tampão de eluição proveniente no kit e armazenado a -80°C. A visualização da integridade e qualidade do mesmo foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio (1 μ g/mL), aplicando-se 1 μ L do RNAm. As amostras foram visualizadas sob luz ultravioleta e digitalizadas em um sistema processador de imagens (Eagle Eye-Stratagene, CA, EUA).



3 MATERIAL E MÉTODOS

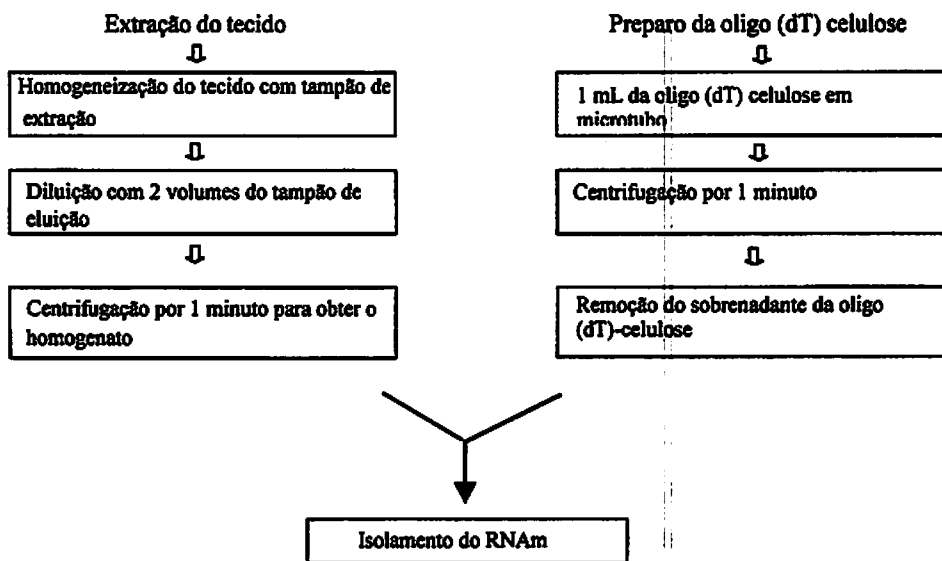
3.1 Local

A germinação das sementes e a indução da hipoxia foram realizadas no setor de Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia, na Universidade Federal de Lavras.

As atividades laboratoriais foram desenvolvidas no Laboratório de Bioquímica de Plantas e Biologia Molecular, do Núcleo de Biologia Aplicada, da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, MG.

3.2 Germinação e hipoxia

Sementes do ciclo 14 de seleção massal sob alagamento intermitente do milho Saracura, cedidas gentilmente pela Embrapa Milho e Sorgo, foram envolvidas em papel de germinação embebido em água ou solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0.75% (p/v), permanecendo por quatro dias em câmara de germinação úmida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ no escuro. Logo após este período, as sementes foram submetidas ao alagamento, realizado em tubos de PVC de 75 mm de diâmetro (quatro rolos com 25 plantas cada um, por tubo), com 1,2 L de tampão de alagamento contendo tris-hidroximetilaminometano 5 mM pH 8, 100 mg.L^{-1} de ampicilina ou o mesmo tampão acrescido de CaCl_2 a 0,75% (p/v). Para diminuir a pressão de oxigênio no tubo, tornando o ambiente hipóxico (3% v/v O_2 em N_2), fez-se borbulhamento com nitrogênio gasoso por 3 minutos (1 L.min^{-1}) e os tubos hermeticamente vedados. Estes tubos foram mantidos no escuro e, após dois dias de estresse, os ápices primários de raiz (5 mm) e o material restante desse órgão foram coletados, separadamente, armazenados em nitrogênio líquido e posteriormente estocados a -80°C até o momento da



Adicionar o homogenato celular ao precipitado da oligo (dT)-celulose

Misturar por 3 minutos

Centrifugar por 10 segundos

Lavar 5x com 1 mL de tampão com alta concentração de sal (mistura, centrifuga e remove o sobrenadante cada vez)

Lavar 2x com 1 mL de tampão com baixa concentração de sal (mistura, centrifuga e remove o sobrenadante cada vez)

Ressuspender o precipitado da oligo (dT)-celulose em 0,3 mL de tampão com baixa concentração de sal

Transferir para as colunas cromatográficas

Centrifugar por 5 segundos

Lavar 3x com 0,5 mL de tampão baixo sal

Eluir o RNAm com 0,2 mL do tampão de eluição a 65°C em duas lavagens

FIGURA 1. Fluxograma da extração e isolamento do RNAm. UFLA, Lavras, MG, 2003.

3.5 Identificação dos genes diferencialmente induzidos por tratamento com cálcio

Para identificação dos genes induzidos pelo Ca^{2+} no ápice das raízes e nas raízes da cultivar Saracura, quando cultivada sob condições de hipoxia, foi utilizado o processo de hibridação subtrativa e PCR por supressão (Diatchenko et al., 1996).

A Figura 2 mostra os principais passos de um experimento de hibridação subtrativa seguida de PCR por supressão e a Figura 3 detalha o esquema utilizado para a obtenção de uma biblioteca subtraída que deve conter os genes diferencialmente induzidos pelos tratamentos impostos na germinação e hipoxia. Para a obtenção das bibliotecas, foi utilizado o PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, EUA) conforme instruções do fabricante.

3.6 Síntese dos cDNAs testes e controles

Para produção das bibliotecas de cDNAs que foram utilizadas nas reações de subtração, foi utilizado o protocolo descrito no “kit PCR Select cDNA Subtraction”, produzido pela Clontech Laboratories Inc. Esse protocolo de subtração requer que, para cada espécie de planta, sejam preparadas duas bibliotecas de cDNA. Uma biblioteca denominada “teste” foi preparada a partir da população de RNAm obtida de raízes e ápices de raízes do milho Saracura germinadas sob alagamento com cálcio e outra biblioteca, denominada “controle”, foi preparada a partir da população de RNAm das raízes e ápices de raízes do milho Saracura germinadas sob alagamento em ausência de cálcio. As populações de RNAm foram preparadas sendo duas populações “teste” (raiz e ápice com cálcio) e duas “controle” (raiz e ápice ausente de cálcio). Para a síntese da 1ª fita de cDNA colocou-se em um microtubo 4 μL de RNAm e 1 μL do primer 10 μM para a síntese de cDNA. Incubou-se a 70°C em termociclador PTC 200 (MJ Research, Massachusetts, EUA) por 2 minutos e resfriou-se em

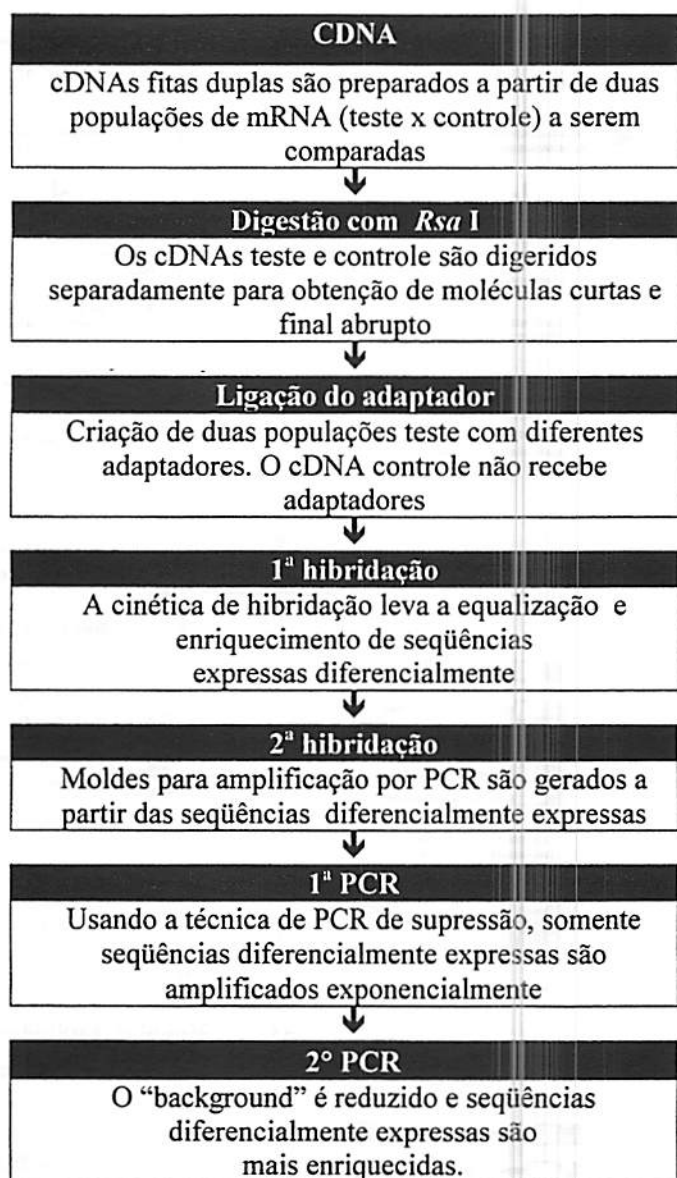


FIGURA 2. Fluxograma do protocolo de hibridação subtrativa e PCR supressivo para identificação de clones de genes diferencialmente expressos (Clontech, 1997). UFLA, Lavras, MG, 2003.

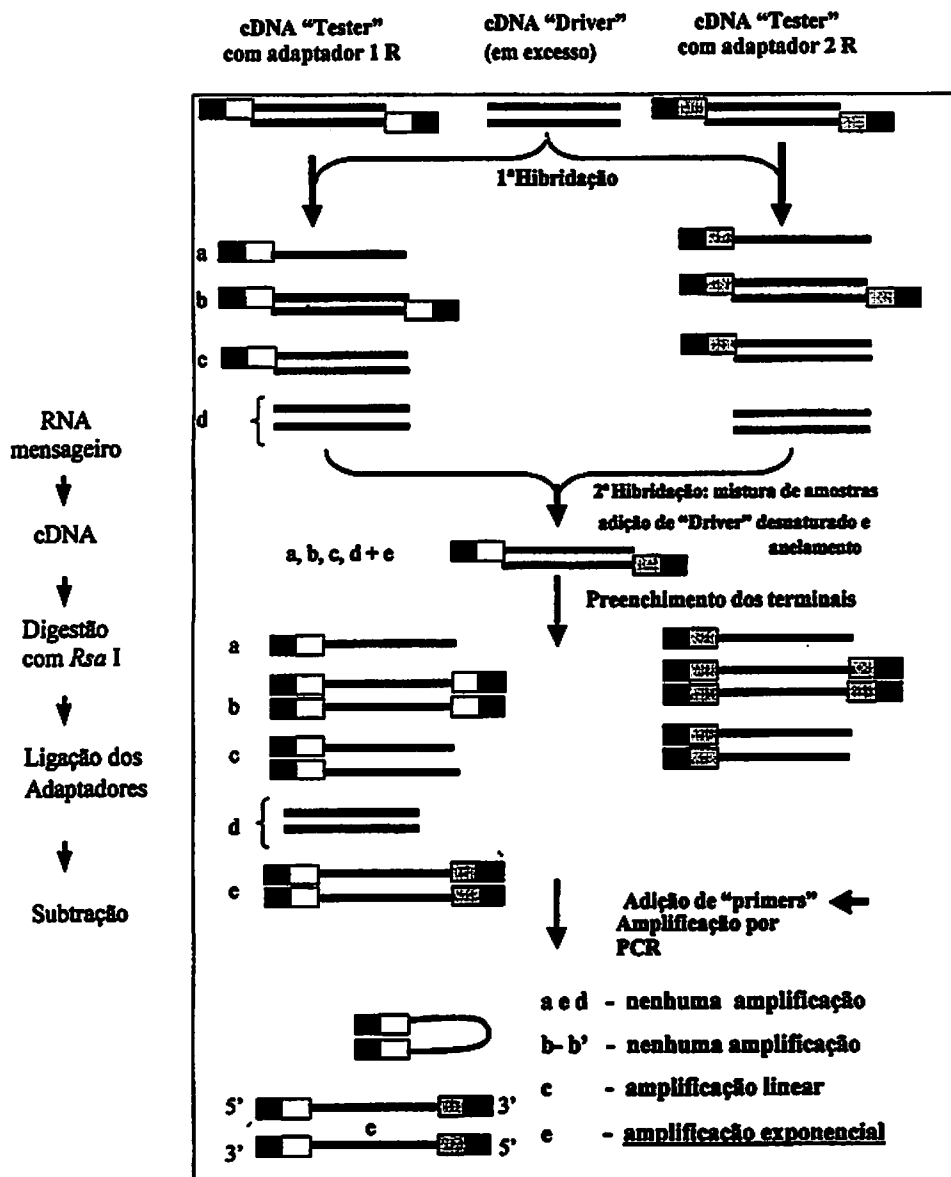


FIGURA 3. Detalhamento do esquema para obtenção de uma biblioteca subtraída contendo genes diferencialmente expressos (Clontech, 1997). UFLA, Lavras, MG, 2003.

gelo por mais 2 minutos. Centrifugou-se rapidamente e adicionaram-se 2 μL do tampão da 1ª fita 5X, 1 μL da mistura dNTP (10mM cada), 1 μL de água estéril e 1 μL da enzima AMV transcriptase reversa (20 U/ μL).

Homogeneizou-se gentilmente e incubou-se por 1 hora e 30 minutos, a 42°C, em termociclador PTC 200. Logo após, os microtubos foram colocados em gelo para a finalização da síntese da 1ª fita de cDNA. Para a síntese da 2ª fita de cDNA adicionaram-se aos microtubos de reação da 1ª fita dos cDNAs testes e controles, 48,4 μL de água estéril, 16 μL de tampão da 2ª fita de cDNA, 1,6 μL da mistura dNTP 10 mM e 4 μL do coquetel da enzima da 2ª fita (20X).

Homogeneizou-se gentilmente e centrifugou-se rapidamente. Incubou-se por 2 horas a 16°C no termociclador. Adicionaram-se 6 U de T4 DNA polimerase e homogeneizou-se. Incubou-se por 30 minutos a 16°C no termociclador. Adicionaram-se 4 μL da mistura EDTA/Glicogênio (20X) para finalizar a síntese da 2ª fita. Para limpeza dos cDNAs sintetizados, adicionaram-se 100 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), vortexou-se e centrifugou-se por 10 minutos, a 16.000 g, à temperatura ambiente. Cuidadosamente, a camada aquosa (superior) foi removida e transferida para outro microtubo esterilizado, descartando-se a interfase e fase inferior. Adicionaram-se 100 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), vortexou-se e centrifugou-se por 10 minutos, a 16.000 g, à temperatura ambiente. A camada aquosa foi removida e transferida para um microtubo. Descartou-se a interfase e a fase inferior. Adicionaram-se 40 μL de acetato de amônio 4M e 300 μL de etanol gelado 95% (v/v). Vortexou-se rapidamente e centrifugou-se por 20 minutos, a 16.000 g, à temperatura ambiente. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante e o precipitado contendo o cDNA foi lavado em 500 μL de etanol gelado 80% (v/v). Centrifugou-se por 5 minutos a 16.000 g. Removeu-se o sobrenadante e secou-se o precipitado na centrífuga a vácuo por 5 minutos.

Ressuspendeu-se o precipitado em 50 μL de água estéril e armazenou-se a -20°C . Para avaliação do rendimento e tamanho dos cDNAs sintetizados, transferiram-se 6 μL para um microtubo para posterior eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio.

3.7 Digestão dos cDNAs com enzima de restrição *Rsa* I

Em microtubos esterilizados, adicionaram-se 43,5 μL do cDNA fita dupla, 5 μL do tampão de *Rsa* I 10X e 1,5 μL da enzima *Rsa* I (10U/ μl). Vortexou-se e centrifugou-se rapidamente. Incubou-se por 1 hora e 30 minutos, a 37°C , em banho-maria. Separaram-se 5 μL da digestão para analisar sua eficiência em gel de agarose 1%. A partir do gel, foi possível avaliar também os cDNAs não digeridos. Após visualizar e fotografar o gel, foi dada continuidade ao processo de digestão. Adicionaram-se 2,5 μL da mistura EDTA/glicogênio para terminar a digestão. Para recuperação dos cDNAs e limpeza de contaminantes, adicionaram-se 50 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e vortexou-se rapidamente. Centrifugou-se por 4 minutos, a 16.000 g, à temperatura ambiente. Removeu-se cuidadosamente a camada aquosa superior e transferiu-se para um novo microtubo esterilizado. Adicionaram-se mais 50 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), vortexou-se e centrifugou-se por 4 minutos a 16.000 g. Removeu-se a camada aquosa superior cuidadosamente que foi transferida para outro microtubo. Adicionaram-se 25 μL de acetato de amônio 4 M e 187,5 μL de etanol gelado 95% (v/v). Vortexou-se rapidamente e centrifugou-se por 20 minutos, a 16.000 g, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e desprezado. Ressuspendeu-se o precipitado em 200 μL de etanol gelado 80% (v/v) e centrifugou-se por 5 minutos a 16.000 g. Removeu-se o sobrenadante, descartando-o. Secou-se o precipitado na centrífuga a vácuo por 5 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado

em 5,5 μL de água estéril e armazenou-se a -20°C . A avaliação da eficiência da digestão com *Rsa* I foi feita por eletroforese em gel de agarose, comparando-se as amostras dos cDNAs sintetizados, antes e depois da digestão.

3.8 Ligação dos adaptadores ao cDNA teste digerido com *Rsa* I

A população “teste” foi subdividida em duas alíquotas: uma recebeu o adaptador 1 e a outra recebeu o adaptador 2R. Os cDNAs “controle” não foram ligados aos adaptadores. Para a ligação, diluiu-se 1 μL do cDNA teste digerido com *Rsa* I em 5 μL de água estéril. Preparou-se uma mistura de ligação, combinando-se 3 μL de água estéril, 2 μL de tampão de ligação (5X) e 1 μL de T4 DNA ligase (400 U/ μL). Em quatro microtubos separadamente, adicionaram-se 2 μL do cDNA teste diluído (ápice 1, ápice 2, raiz 3, raiz 4), 2 μL de adaptador 1 (10 μM) no ápice 1 e na raiz 3 e 2 μL de adaptador 2R (10 μM) no ápice 2 e na raiz 4 e 6 μL da mistura em todos os microtubos, perfazendo um volume de 10 μL . Centrifugou-se rapidamente e incubou-se a 16°C por uma noite. A reação de ligação foi interrompida adicionando-se 1 μL da mistura EDTA/glicogênio e as amostras foram aquecidas por 5 minutos, a 72°C , para inativar a DNA ligase.

3.9 Híbridizações

Foram feitas duas híbridizações, sendo a primeira com objetivo de normalizar e enriquecer as seqüências expressas diferencialmente e a segunda hibridação com intuito de gerar moldes para amplificação de PCR a partir das seqüências expressas diferencialmente. Em quatro microtubos preparou-se a reação contendo 1,5 μL de cDNA controle digerido com *Rsa* I em todos os microtubos; 1,5 μL da população teste ligada ao adaptador 1 somente nos microtubos referentes ao ápice 1 e raiz 3; 1,5 μL da população teste ligada ao

adaptador 2R, somente nos microtubos referentes ao ápice 2 e raiz 4 e 1 μL do tampão de hibridação (4X) em todos os microtubos. Incubou-se por 90 segundos a 98°C em termociclador PTC 200 e, após esse tempo, incubou-se novamente por 7 horas a 68°C . Na segunda hibridação, inicialmente, desnaturou-se a população controle (ápice e raiz do tratamento sem cálcio), adicionando-se nos microtubos 1 μL de cDNA controle de ápice, 1 μL de tampão de hibridação (4X) e 2 μL de água estéril. O mesmo foi feito para cDNA controle raiz. Incubou-se por 90 segundos a 98°C em termociclador. Pipetou-se o conteúdo do primeiro microtubo da primeira hibridação (ápice 1) e transferiu-se para o segundo microtubo (ápice 2) da primeira hibridação. A esta mistura adicionou-se 1 μL do cDNA controle de ápice de raiz desnaturado. Depois, pipetou-se o conteúdo do terceiro microtubo da primeira hibridação (raiz 3) e transferiu-se para o quarto microtubo da primeira hibridação (raiz 4). A esta mistura, adicionou-se 1 μL do cDNA controle de raiz desnaturado. Este passo foi feito rapidamente e os microtubos da primeira hibridação permaneceram no termociclador PTC 200 durante todo tempo. Incubou-se a reação por uma noite, a 68°C . Para finalizar a segunda hibridação, adicionaram-se 200 μL do tampão de diluição, homogeneizou-se, aqueceu-se por 7 minutos a 68°C e os produtos obtidos foram armazenados a -20°C .

3.10 Amplificação por PCR

Foram feitas duas amplificações por PCR sendo que na primeira, utilizando-se de PCR por supressão, tinha-se o intuito de obter somente as seqüências diferencialmente expressas amplificadas exponencialmente. A segunda amplificação foi realizada com o objetivo de reduzir os fragmentos inespecíficos e enriquecer ainda mais as seqüências diferencialmente expressas. Na primeira amplificação por PCR, preparou-se uma mistura contendo 54,25 μL de água estéril, 8,75 μL de tampão de reação de PCR (10X), 1,75 μL da mistura

dNTP (10 mM), 3,5 μ L de oligonucleotídeo iniciador 1 (10 mM) e 1,75 μ L da mistura cDNA polimerase Advantage (50X) fornecida pelo PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, EUA). Transferiram-se 24 μ L da mistura para cada microtubo e adicionou-se 1 μ L do cDNA de ápice de raiz proveniente da segunda hibridação e, em outro microtubo, adicionou-se 1 μ L do cDNA de raiz proveniente da segunda hibridação e, em um 3º microtubo, preparou-se uma reação de PCR controle, de cDNA subtraído, proveniente do kit. Inicialmente, incubaram-se as reações em termociclador PTC 200 por 5 minutos a 75°C, para estender o adaptador. Imediatamente iniciaram-se os ciclos de amplificação, sendo 94°C por 25 segundos seguido de 27 ciclos de 94°C por 10 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos. Antes de iniciar a segunda amplificação com “oligonucleotídeo iniciador nested” avaliou-se a eficiência da primeira reação de PCR em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (1 μ g/mL), visualizado sob luz ultravioleta e digitalizado em um sistema processador de imagens (Eagle Eye-Stratagene, CA, EUA).

Para realizar o segundo PCR, diluíram-se 3 μ L de cada reação do primeiro PCR em 27 μ L de água estéril. Armazenou-se o restante a -20°C. Preparou-se a mistura do segundo PCR, contendo 64,75 μ L de água estéril, 8,75 μ L de tampão de reação de PCR (10X), 3,5 μ L de oligonucleotídeo iniciador 1 “nested” (10 μ M), 3,5 μ L oligonucleotídeo iniciador 2R “nested” (10 μ M), 1,75 μ L de mistura dNTP (10 μ M), 1,75 da mistura cDNA polimerase Advantage (50X). Transferiram-se 24 μ L da mistura para cada microtubo de PCR e adicionou-se 1 μ L do produto da primeira amplificação diluído, referente ao cDNA de cada amostra. Foram realizados 18 ciclos de 94°C por 10 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Após os 18 ciclos, incubou-se a 72°C por 7 minutos. Para avaliação e visualização dos produtos gerados, aplicaram-se 8 μ L de cada reação em gel de agarose 2%, corou-se com brometo

de etídio (1 µg/mL), visualizou-se sob luz ultravioleta e digitalizou-se em um sistema processador de imagens (Eagle Eye-Stratagene). O restante da segunda reação de PCR foi armazenado a -20°C.

3.11 Preparo das células competentes de *E. coli* (DH5α)

Para clonagem dos produtos da segunda amplificação por PCR, prepararam-se células competentes utilizando-se cloreto de cálcio, segundo metodologia de Sambrook et al. (1989) modificado. Inoculou-se uma colônia de *E. coli* (DH5α) isolada em 3 mL de meio Circle Grow (Bio 101, Carlsbad, CA) e incubou-se, por uma noite, a 37°C sob agitação a 200 rpm. Transferiram-se 2mL para 100 mL do meio Circle Grow e incubou-se a 37°C sob agitação até densidade ótica de 600 nm ($O.D._{600} = 0,5$). O crescimento bacteriano foi interrompido, resfriando-se o Erlenmeyer em banho de gelo. Centrifugou-se a solução bacteriana por 5 minutos, a 1000 g, a 4°C e descartou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 20 mL de solução gelada de $MgCl_2$ 0,1 M, centrifugadas por 5 minutos, a 1000 g, a 4°C, descartando-se o sobrenadante. Adicionaram-se 50 mL de solução gelada de $CaCl_2$ 0,1 M às células, que foram incubadas em gelo por 20 minutos, centrifugadas e ressuspensas em 10 mL de solução gelada de $CaCl_2$ 0,1 M. Adicionou-se 1,5 mL de glicerol estéril (15%), homogeneizou-se gentilmente e prepararam-se alíquotas em microtubos que foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

Clonagem dos produtos da segunda amplificação de PCR

Os produtos da segunda amplificação por PCR, obtidos das reações de subtração direta, foram clonados no vetor PCR^R 2.1 TOPO, utilizando-se o "Kit TOPO TA Cloning for Sequencing" (Invitrogen, Carlsbad, CA). Primeiramente, preparou-se a reação de ligação, que consistiu de 2 µL de água estéril, 1 µL de solução salina (NaCl 1,2 M, $MgCl_2$ 0,06 M), 3 µL do produto do segundo PCR, 1 µL do vetor Topo TA. Incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente e,

após este tempo, as amostras foram colocadas no gelo. Para a transformação química, células competentes da cepa de *E. coli* DH5 α (preparadas segundo item 3.11) foram descongeladas em gelo por 15 minutos, transferindo-se 2 μ L da ligação para o tubo contendo estas células competentes sem homogeneizar e armazenou-se o restante da ligação a -20°C. Incubou-se por 30 minutos no gelo. Após este tempo, os tubos foram colocados por 30 segundos a 42°C em banho-maria e imediatamente passados para o gelo por 2 minutos. Adicionaram-se 250 μ L de meio SOC (2% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM de glicose) proveniente do “Kit TOPO TA Cloning for Sequencing” (Invitrogen). Agitou-se em incubadora-agitadora por 1 hora, a 200 rpm, a 37°C. Plaquearam-se 250 μ L de cada ligação em placas de Petri contendo meio Circle Grow sólido, com 200 μ g/mL de ampicilina, 4 μ L de IPTG (200 mg/mL) e 40 μ L de X-GAL (20 mg/mL). Incubou-se as placas por uma noite a 37°C. O vetor PCR[®] 2.1 TOPO utilizado incorpora a tecnologia LacZ α e permite a seleção branco/azul dos clones. As colônias azuis são descartadas por não terem sido transformadas.

3.12 Preparação dos plasmídeos para digestão e ligação dos insertos

As colônias brancas isoladas foram inoculadas em microplacas de 96 poços para preparação do plasmídeo. Para tal, adicionou-se 1 mL de meio Circle Grow (Bio 101, Carlsbad, CA) contendo ampicilina (200 μ g/mL) em cada poço das microplacas e cada colônia branca foi inoculada individualmente, com auxílio de palitos de madeira esterilizados. Cada placa foi selada com adesivo e, logo após, o mesmo foi furado com auxílio de uma agulha aquecida em chama, para que houvesse aeração em cada poço. Agitou-se em incubadora-agitadora por 23 horas, a 220 rpm, a 37°C. Preparou-se cultura permanente em placas estéreis, contendo 100 μ L do plasmídeo, 100 μ L de glicerol 20% estéril e estocou-se em freezer a -80°C. Para a extração dos plasmídeos, foi utilizado o

método de lise alcalina descrito por Sambrook et al. (1989) modificado. As placas contendo a cultura de bactérias foram centrifugadas por 6 minutos, a 2250g, para sedimentação das células. Removeu-se o adesivo, descartou-se o sobrenadante e inverteram-se as placas sobre papel absorvente por 2 minutos. Adicionaram-se 200 μL de solução GET (1% de glicose; 0,01M EDTA; 0,026M tris-HCl, pH 7,4) em cada poço e ressuspenderam-se as células em vortex. Centrifugou-se por 10 minutos, a 2.250 g, para sedimentação das células. Retirou-se o adesivo, descartou-se o sobrenadante e inverteram-se as placas sobre papel absorvente por 2 minutos Preparou-se uma solução contendo 20 mL de GET e 600 μL de RNase [300 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Adicionaram-se 80 μL desta solução GET/RNase em cada poço, selou-se com adesivo e agitou-se em vortex por 2 minutos para ressuspender as células. Transferiram-se 60 μL da suspensão de células para uma nova microplaca de 250 μL de polipropileno (tipo placa Elisa). Adicionaram-se 80 μL de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1% a cada poço). Selou-se e homogeneizou-se, invertendo-se cada placa 30 vezes. Incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se rapidamente para remover toda a solução do adesivo. Adicionaram-se 80 μL de acetato de potássio 3M a cada poço. Selaram-se as placas e homogeneizou-se 30 vezes por inversão. Incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se rapidamente. Removeu-se o adesivo e incubaram-se as placas abertas, em estufa a 90°C, por 30 minutos. As placas foram seladas novamente e colocadas em gelo picado por 10 minutos Centrifugou-se por 9 minutos a 2.250 g. Transferiu-se todo o volume do sobrenadante para uma placa Millipore (MAGV N22) fixada sobre uma microplaca de fundo "U" de 250 μL de polipropileno e centrifugou-se a placa aberta, por 4 minutos, a 2.250 g. Adicionaram-se 100 μL de isopropanol ao filtrado que ficou na microplaca, selou-se bem a placa com adesivo e centrifugou-se por 45 minutos, a 2.250 g. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 100 μL de etanol 70% (v/v) gelado. Centrifugou-se por

10 minutos, a 2.250 g. Removeu-se o sobrenadante e centrifugaram-se rapidamente as placas invertidas sobre papel absorvente. A seguir, as placas foram deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos para secagem, cobertas com papel absorvente. Ressuspendeu-se o DNA plasmidial em 30 μ L de água MilliQ. As placas foram seladas com adesivo e armazenadas em freezer a -20°C .

3.13 Digestão dos clones

Fez-se a digestão dos clones com a enzima de restrição *Eco* RI (BRL), preparando-se uma mistura contendo água MilliQ, tampão da enzima 10X, enzima *Eco* RI (10 U/ μ L) e 3,0 μ L de cada DNA plasmidial, incubando-se por 2 horas a 37°C em banho-maria. Para verificar a presença e o tamanho dos insertos e a eficiência da digestão, as amostras foram corridas em um gel de agarose 1%. O gel foi corado com brometo de etídio (1 μ g/mL), visualizado sob luz ultravioleta e digitalizado em um sistema processador de imagens (Eagle Eye-Stratagene).

3.14 Reação de seqüenciamento dos clones

As seqüências de DNA foram determinadas pelo método de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (Sanger et al., 1977) adicionando-se a cada poço da placa de seqüenciamento 4,0 μ L do "kit DYEnamic ET Dye Terminator" (Amershan Pharmacia), 3,2 μ M de oligonucleotídeo iniciador pUC/M13 "Forward"- 5' CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3' (Invitrogen) e 4,0 μ L (~ 400 ng) de cada plasmídeo. A reação foi colocada no termociclador PTC 200, programado para 30 ciclos a 96°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Para a precipitação da reação de seqüenciamento, adicionou-se 1,0 μ L de acetato de amônio 7,5 M e 30 μ L de etanol 95% (v/v), incubou-se por 20 minutos no escuro e centrifugou-se por

45 minutos, a 2.250 g. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 100 µL de etanol 70% (v/v), centrifugando-se por 5 minutos, a 2.250 g. O sobrenadante foi descartado e a placa rapidamente centrifugada, invertida sobre papel absorvente e deixada descoberta por 20 minutos no escuro para secar. Ressuspendeu-se a reação em 10 µL de “Loading Buffer” (kit DYEnamic ET Dye Terminator-Amersham Pharmacia, Piscataway, EUA), vortexou-se por 2 minutos, centrifugou-se rapidamente e injetou-se no seqüenciador Mega Bace 1000 (Amersham Biosciences, Piscataway, EUA). Após este procedimento, preparou-se uma nova reação utilizando-se os mesmos clones e o oligonucleotídeo iniciador pUC/M13 “Reverse” – 5’ TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C 3’(Invitrogen)

3.15 Análise dos clones

Após a remoção das seqüências correspondentes ao vetor, as seqüências “forward” e “reverse” de cada clone foram alinhadas, utilizando-se o programa CAP (<http://bio.ifom-firc.it/ASSEMBLY/assemble.html>), obtendo-se uma seqüência consenso para cada clone. Comparou-se então com as seqüências depositadas no banco de dados “Genbank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando-se o programa Blast N. Os clones selecionados da biblioteca de raiz das plântulas de milho submetidas a hipoxia foram também analisados nos programas Expasy (www.expasy.org), Prosite (<http://bo.expasy.org/prosite/>) e Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>).

3.16 Análise de Southern Blot

Obtenção do tecido vegetal

Sementes do milho Saracura foram plantadas em canteiro e, após 10 dias de desenvolvimento, as folhas foram coletadas, acondicionadas em saco plástico e transportadas sob gelo até o laboratório para imediata extração de DNA.

Extração do DNA genômico

Aproximadamente 3 g de folha fresca foram maceradas em nitrogênio líquido, sendo o DNA extraído pelo método do CTAB, segundo metodologia desenvolvida por Saghai-Marooof et al. (1984) com algumas modificações. Após a maceração do tecido vegetal, acrescentaram-se 20 mL de tampão CTAB 2X contendo tris-HCl 200 mM, pH 8,0 contendo NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, pH 8,0, CTAB 2% (p/v) e 2-mercaptoetanol 2% (v/v), em tubos de polipropileno. A seguir, a reação foi incubada por 1 hora e 30 minutos a 65°C, com cuidadosa agitação por inversão a cada 15 minutos. Após este período, resfriou-se o homogenato à temperatura ambiente por 5 minutos e acrescentaram-se 5 mL de clorofórmio:octanol 24:1. Homogeneizou-se durante 10 minutos por inversão e centrifugou-se por 10 minutos a 3000 g. Transferiu-se o sobrenadante para novos tubos de polipropileno, acrescentaram-se novamente 5 mL de clorofórmio:octanol 24:1, homogeneizou-se e centrifugou-se para a coleta do sobrenadante. Este foi transferido para tubos de vidro e acrescentou-se 0,6 volume de isopropanol gelado. Homogeneizou-se gentilmente até a precipitação do DNA e, com auxílio de um anzol de vidro, transferiu-se todo o DNA para um tubo contendo etanol 70% (v/v), que foi incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Após este período, o DNA foi seco em papel absorvente e transferido para microtubos contendo 700 µL de tampão TE pH 8,0 (tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM) e 3 µL de RNase (40 µg/mL). O DNA ressuspendido foi armazenado a 4°C.

Quantificação do DNA

Quantificou-se a amostra de DNA por eletroforese em gel de agarose 1%. Para tal, aplicou-se 1 µL da amostra diluída 1:5 e 1:10, comparou-se com DNA de concentração conhecida, corou-se o gel com brometo de etídio (1µg/mL), visualizou-se sob luz ultravioleta e digitalizou-se em um sistema processador de imagens (Eagle Eye-Stratagene).

Digestão do DNA com enzimas de restrição

Aproximadamente 40 µg de DNA foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* (10 U/µL) e *BamHI* (10 U/µL), por uma noite, a 37°C. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, a 45 V, por uma noite. Corou-se o gel com brometo de etídio (1µg/mL), visualizou-se e fotografou-se em "Eagle Eye".

Transferência do DNA para membrana de náilon

Os fragmentos de DNA digeridos foram aplicados em seis canaletas diferentes (~ 40 µg por canaleta) para que fossem testadas seis sondas diferentes, provenientes dos clones oriundos da biblioteca de subtração. Os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose foram transferidos para membrana de náilon (Hybond-N+ - Amersham Biosciences) por cerca de 20 horas, de acordo com metodologia de Southern (1975). O DNA foi transferido do gel para a membrana por meio de fluxo capilar, na presença do tampão de transferência (solução de hidróxido de sódio 0,4 M). Sobre uma bandeja de vidro tipo "pirex" foi apoiada uma placa de vidro e, sobre esta placa, apoiou-se uma folha de papel de filtro 3MM, da largura do gel, de modo que suas extremidades ficassem submersas no tampão de transferência. Colocou-se o gel sobre esta "ponte" de papel montada sobre o vidro e, logo após, colocou-se a membrana de náilon cortada no tamanho do gel. Por cima da membrana, colocou-se um papel de filtro 3MM com as mesmas dimensões da membrana e do gel. As bolhas de ar foram retiradas com auxílio de uma pipeta de vidro. Sobre este conjunto colocou-se uma pilha de papel absorvente, uma placa de vidro e um peso para auxiliar na transferência. Após o período de transferência, a membrana foi cortada em seis pedaços que foram transferidos para estufa a 55°C em papel de filtro 3MM, para secar por 5 minutos.

Preparação das sondas de DNA

Para a obtenção das sondas, preparou-se a reação de PCR para amplificação dos insertos e posterior marcação da sonda. Foram testada seis sondas e, para a reação, preparou-se uma mistura contendo água estéril, tampão de reação de PCR 10 X, oligonucleotídeo iniciador pUC/M 13 “forward” 10 μM , oligonucleotídeo iniciador pUC/ M13 “reverse” 10 μM , mistura de dNTPs e *Taq* DNA polimerase. Distribuiu-se a mistura em cada microtubo e acrescentaram-se 2 μL do DNA plasmidial diluído 30X. As reações foram efetuadas em termociclador PTC 200 utilizando-se do ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e seguiram-se 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Após este ciclo, 72°C por 10 minutos. Preparou-se uma eletroforese em gel de agarose 1%, corou-se com brometo de etídio, visualizou-se e fotografou-se em “Eagle Eye”. As bandas foram isoladas do gel e purificadas utilizando-se o “QIAquick Gel extraction Kit” (QIAGEN). As bandas foram pesadas e foram adicionados 3 vezes o volume do gel, de tampão “QG” fornecido pelo kit e incubou-se a 65°C até que a agarose estivesse totalmente dissolvida. Adicionaram-se 300 μL de isopropanol e transferiu-se a amostra para uma coluna “QIAquick”, centrifugando-se por 1 minuto, a 10.000g. Repetiu-se este procedimento descartando-se, em seguida, o filtrado. Adicionaram-se 750 μL de tampão PE, fornecido pelo kit, na coluna, incubou-se por 5 minutos e centrifugou-se por 1 minuto na mesma rotação da etapa anterior. Descartou-se o filtrado e centrifugou-se a coluna por mais 1 minuto. Transferiu-se a coluna para um novo microtubo e adicionaram-se 15 μL de água miliQ, centrifugou-se por 1 minuto a 10.000 g e acrescentou-se mais 15 μL de água miliQ, centrifugando-se em seguida por 1 minuto, armazenando-se o filtrado a -20 °C. Após purificação, as amostras foram quantificadas, comparando-se com DNA de concentração conhecida, por eletroforese em gel de agarose 1,0%,

corado com brometo de etídio visualizado sob luz ultravioleta e digitalizado em um sistema processador de imagens (Eagle Eye-Stratagene).

Marcação das sondas

Os DNAs sondas foram marcados diretamente com fosfatase alcalina utilizando-se o kit AlkPhos Direct (Amersham Biosciences). O DNA foi diluído para uma concentração de 10 ng/mL, desnaturado por 5 minutos a 95°C e imediatamente colocado no gelo por 5 minutos. Centrifugou-se rapidamente e adicionou-se 10 µL do tampão de reação (fornecido pelo kit). Adicionaram-se 2 µL do reagente de marcação e homogeneizou-se gentilmente. Adicionaram-se 10 µL da solução “*cross-linker*” (fornecido pelo kit), homogeneizou-se e centrifugou-se rapidamente. A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C em banho-maria. Após este tempo, colocou-se a sonda no gelo por 30 minutos.

Hibridação

As membranas foram incubadas a 55°C com 10 mL de tampão de hibridação “AlkPhos Direct” (Amersham Biosciences) pré-aquecido a 55°C. As membranas foram pré-hibridadas em forno de hibridação a 55°C por 3 horas e 30 minutos. Em seguida, 100 ng de sonda foram adicionados ao tampão de hibridação e as membranas permaneceram a 55°C por uma noite.

Lavagem das membranas após hibridação

Preparou-se o primeiro tampão de lavagem contendo uréia 2M, SDS 0,1% (p/v), tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, cloreto de sódio 150 mM, cloreto de magnésio 1 mM e reagente de bloqueio (fornecido pelo “kit AlkPhos Direct”- Amersham Biosciences) 0,2% (p/v). A solução foi pré-aquecida a 55°C e transferidas para as membranas, lavando-as por 10 minutos no forno de hibridação a 55°C. Repetiu-se a lavagem com este tampão. As membranas foram transferidas para o segundo tampão de lavagem contendo tris-base 1 M, cloreto de sódio 2 M e cloreto de magnésio 1M. As membranas foram lavadas por 5

minutos à temperatura ambiente sob agitação, repetindo-se este passo mais uma vez.

Detecção do sinal


Retirou-se o excesso do segundo tampão de lavagem e as membranas foram colocadas sob o “folder”, não se permitindo a secagem completa das mesmas. Pipetou-se o reagente de detecção ($30 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ -fornecido pelo kit) sobre as membranas, colocou-se o outro “folder” por cima e espalhou-se bem com papel absorvente retirando todo o excesso do reagente. Selaram-se as bordas com filme plástico, transferindo-o para o cassete “Kodack-Exposure Holder”. Em ambiente escuro, colocou-se um filme de raio X (Hyperfilm ECL) sobre as membranas com os DNAs voltados para cima em contato com o filme. Fechou-se o cassete, colocou-se em saco plástico escuro permanecendo-se exposto por 3 horas em temperatura ambiente. Após este período, removeu-se o filme de raio X e procedeu-se à revelação também no escuro, utilizando-se solução reveladora (GBX-Developer, Kodak-Sigma, St. Louis, EUA) por 2 minutos, água por 3 minutos e solução fixadora (GBX-Fixer, Kodak-Sigma, St. Louis, EUA) por 2 minutos Secou-se o filme para posterior análise.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Influência do cálcio na germinação e na sobrevivência das plântulas submetidas a hipoxia

Pela análise visual, observou-se que as plântulas submetidas a quatro dias de germinação, sob influência da solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v), apresentaram redução acentuada no crescimento em relação às plântulas germinadas sem esta solução. Ao estudar a influência do cálcio na germinação, Fries (2003) verificou, para o milho Saracura, uma redução drástica no ganho de massa seca das plântulas. Diferenças no crescimento da parte aérea foram pronunciadas a partir do terceiro dia de germinação, enquanto que diferenças significativas no crescimento das raízes passaram a ocorrer a partir do segundo dia. Esses resultados foram primeiramente verificados por Purcino (2001), que observou uma redução no comprimento de raiz e coleótilo, além da redução na massa seca quando as plântulas foram germinadas em meio contendo solução de cloreto de cálcio. Isto ocorre porque a substituição da água pelo cloreto de cálcio na germinação leva a uma preservação das reservas na cariopse, comprometendo o crescimento das plântulas (Purcino, 2001).

No presente trabalho, as plântulas sobreviveram após 48 horas de estresse hipóxico, tanto em solução de cloreto de cálcio como na ausência deste, apresentando, na presença de cálcio, crescimento reduzido com relação às plântulas alagadas sem influência do cálcio exógeno. Além disso, em ambos os tratamentos, as plântulas não apresentaram sinal de injúria neste período. Em seu trabalho, Fries (2003) observou que, na ausência de cálcio na germinação e no tampão de alagamento, a sobrevivência a estresse hipóxico diminuiu significativamente com o aumento da idade. Noventa e três por cento das



plântulas de dois dias de germinação conseguiram sobreviver a 3 dias de hipoxia, enquanto que apenas 53% das plântulas de 4 dias sobreviveram. Quando o cálcio esteve presente tanto no papel de germinação quanto no tampão de alagamento, não houve diferença na sobrevivência entre plântulas de 2 ou 4 dias de germinação.

4.2 Eficiência da subtração

Os produtos da primeira e segunda amplificação da hibridação subtrativa foram visualizados em gel de agarose 2% (Figura 4), ligados no vetor TOPO TA 2.1 e clonados em *E. coli* DH5 α . Obtiveram-se 96 colônias brancas das amostras provenientes da raiz e 44 colônias brancas das amostras do ápice. Essas colônias foram inoculadas em meio de cultura e foi feita a extração dos plasmídeos. Os plasmídeos obtidos foram digeridos com *EcoRI* (Figura 5) e 38 clones da biblioteca de raiz e 36 clones da biblioteca de ápice do milho Saracura apresentaram insertos. No entanto, oito clones com inserto da biblioteca do ápice de raiz foram selecionados para o seqüenciamento por apresentarem tamanhos diferentes. Os clones com inserto foram seqüenciados e as melhores seqüências obtidas, 26 da raiz (Tabela 1) e 7 do ápice (Tabela 2), foram alinhadas e, a partir das seqüências consenso obtidas, comparadas com seqüências depositadas no GenBank. Dos 26 clones da raiz, 11 eram vetores e 2 seqüências, F12 e C02, apresentaram 100% de identidade com a seqüência de milho (*Zea mays* L.) identificados no projeto de mapeamento de milho, como PC0097531 (acesso n° AY104613.1, *e-value* 0.001 e *score* 50). No entanto, o melhor alinhamento dos referidos clones foi com a seqüência da proteína ribossomal mitocondrial humana (acesso n° BC034460.1, *e-value* 3e-66 e *score* 258) com 100% de identidade.

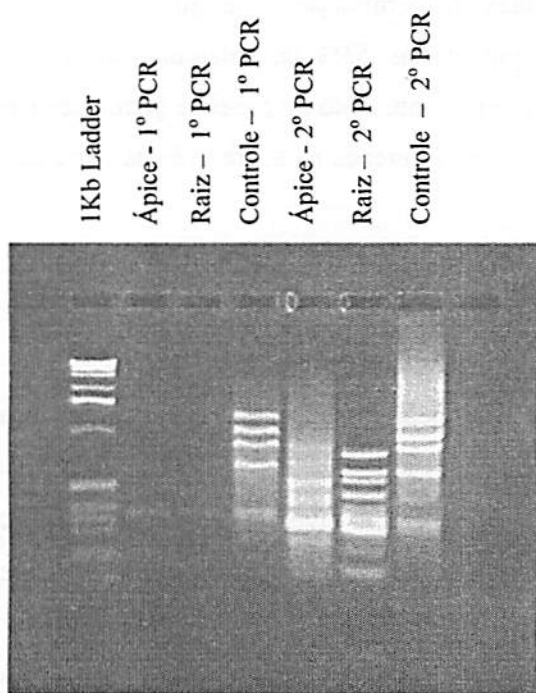


FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da primeira e segunda amplificação da hibridação subtrativa de cDNAs de ápice de raiz e raiz de plântulas de milho submetidas à hipoxia. UFLA, Lavras, MG, 2003.

A comparação das seqüências dos clones referentes ao material proveniente da hibridação subtrativa, desenvolvida a partir da raiz com as seqüências depositadas no Genbank, revelou que os clones A03 e H12 possuem 98% de identidade com o gene de mioglobina humana (acesso nº BC014547.1 no GenBank; *e-value* 2e-39 e *score* 168). Esta seqüência foi analisada no programa Expasy para a obtenção da seqüência da proteína e, posteriormente, analisada também no programa Pfam e não foi encontrada identidade com nenhuma seqüência depositada neste banco.

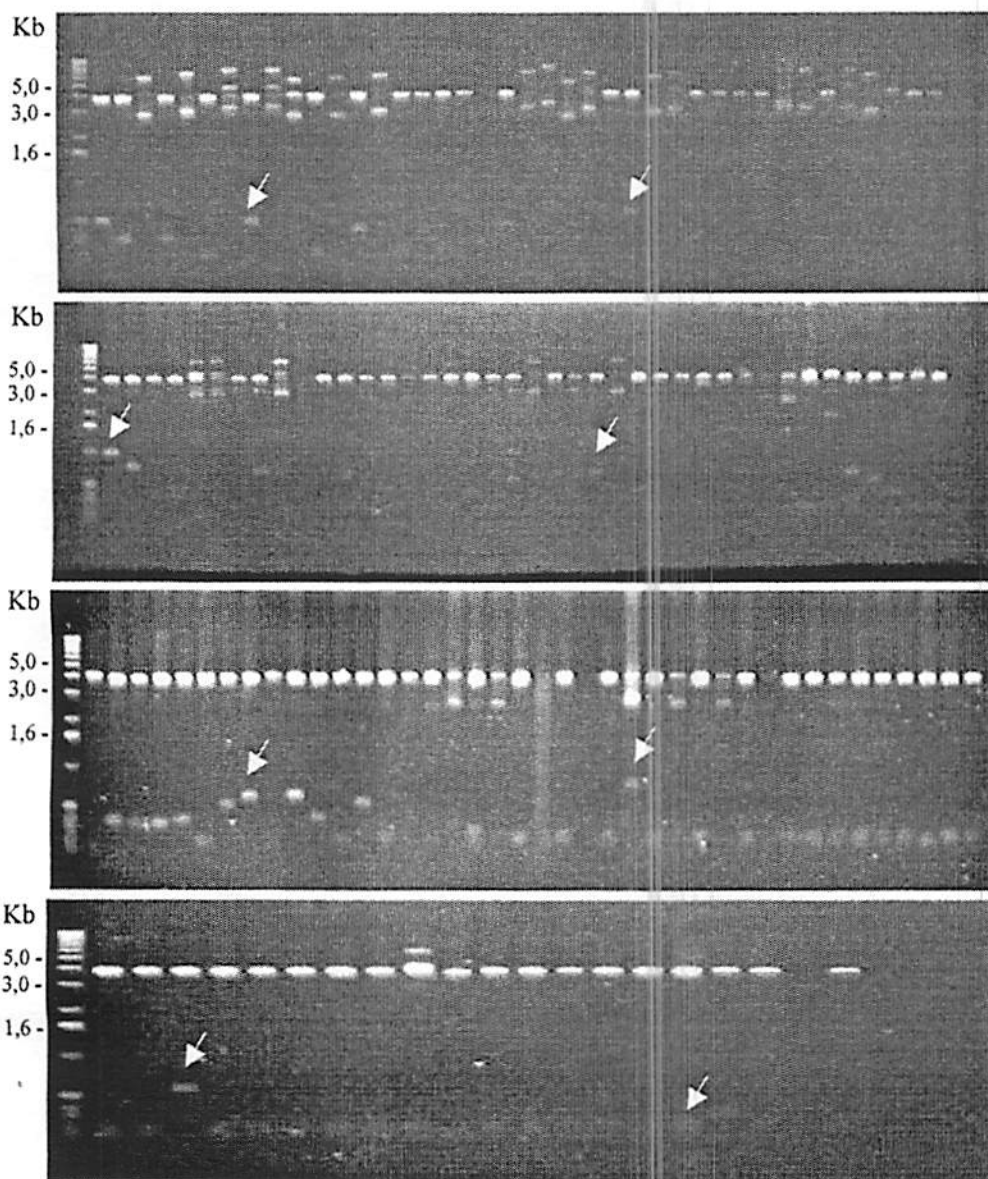


FIGURA 5. Perfil dos clones digeridos com *EcoRI* mostrando os insertos. As setas indicam alguns dos clones selecionados para seqüenciamento de ápice de raiz e de raiz submetidos a hipoxia. UFLA, Lavras, MG, 2003

TABELA 1: Resultados encontrados no banco de dados (GenBank) referentes à biblioteca de raiz do milho Saracura, submetida a hipoxia. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Clone	Descrição no banco de dados (GenBank)	<i>e-value</i>	Identidade	Score
A02	Vetor	e-143	99%	515
A03	<i>Homo sapiens</i> mioglobina	1e-35	97%	157
A11	<i>Zea mays</i> PCO096382 RNAm	2e-39	90%	168
A12	Vetor	e-144	97%	519
B02	Vetor	e-156	100%	557
B04	Vetor	e-173	100%	613
B05	<i>H. sapiens</i> proteína-ligante FK506	3e-81	91%	309
B10	Vetor	e-137	98%	496
B11	Vetor	e-110	95%	404
B12	Vetor	e-139	98%	502
C02	<i>H. sapiens</i> prot. mitocondrial ribossomal	5e-71	100%	274
C11	Vetor	e-138	99%	500
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
E09	Vetor	e-166	99%	591
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
F11	Vetor	e-156	98%	559
F12	<i>H. sapiens</i> prot. mitocondrial ribossomal	3e-66	100%	258
G01	Vetor	e-170	100%	603
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

Tabela 2: Resultados encontrados no banco de dados (GenBank) referentes à biblioteca de ápice de raiz do milho Saracura, submetido a hipoxia. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Clone	Descrição no banco de dados (GenBank)	<i>e-value</i>	Identidade	<i>Score</i>
A02	<i>Ixodes ricinus</i> glutationa S-transferase	3e-05	100%	56
B02	<i>Zea mays</i> 25s rRNA gene	1e-46	97%	192
B04	<i>Z. mays</i> gliceraldeído-3-P desidrogenase	0,0	99%	1013
C02	<i>Dianthus caryophyllus</i> provável proteína	2e-06	100%	60
	MtN3			
D06	<i>Oryza sativa</i> cultivar japônica DNA	e-144	97%	517
E01	<i>Z. mays</i> 25s rRNA gene	3e-59	100%	234
G03	<i>Z. mays</i> 25s rRNA gene	7e-51	100%	206

Apesar da mioglobina ser uma proteína descrita na espécie animal, sua função pode estar relacionada à resposta da planta ao estresse, uma vez que possui alta afinidade pelo oxigênio em condições de pequenas pressões parciais, permitindo que ela se ligue e estoque o oxigênio de forma eficaz. Ela estoca o oxigênio e o libera para mitocôndria. Outro ponto é que pode-se tratar de uma hemoglobina, uma vez que a cadeia polipeptídica da mioglobina tem regiões muito similares às cadeias da hemoglobina, indicando que esses polipeptídeos, mioglobina e cadeia alfa e beta da hemoglobina são evolutivamente próximos (Lehninger, 1993). A função exercida pela hemoglobina, proteína já descrita em plantas (Dordas et al., 2003), é transportar o oxigênio com grande eficiência.

O clone A11 apresentou 90% de identidade com a seqüência de RNAm de milho PCO096382 (acesso nº AY106053.1, *e-value* 2e-39 e *score* 168). Esta seqüência foi obtida no projeto de mapeamento do milho (Maize Mapping Project, University of Missouri, Columbia, MO 65211, EUA), mas ainda não foi atribuída função à proteína. O programa Prosite revelou que a seqüência do clone A11 apresenta sítio de fosforilação da proteína quinase c (PKC). As

proteínas quinases *c* constituem uma família heterogênea de quinases de fosfolipídios que podem ser divididas em três grandes grupos, baseadas no mecanismo de ativação e na estrutura (Jaken, 1996). As PKCs convencionais requerem a presença de fosfatidil serina, diacilglicerol e cálcio. Quando ativadas pelo diacilglicerol ou pelo aumento na concentração de Ca^{2+} , adicionam grupos fosfato às proteínas-alvo em resíduos de serina e treonina (Nishizuka, 1995). As PKCs dependentes de cálcio são as únicas famílias de quinases que possuem domínio regulatório, com quatro extremidades de ligação para o cálcio, como o C-terminal de calmodulina. Elas, provavelmente, são importantes sensores primários dos sinais de cálcio e foram identificadas inicialmente em plantas e protozoários (Zhao et al., 1993).

O clone B05 apresentou 91% de identidade com a proteína ligante-FK506 humana (acesso nº NM-012181.2, *e-value* 3e-81 e *score* 309). As proteínas ligantes-FK506 (FKPB), codificadas pelo gene *UCU2* (Pérez-Pérez et al., 2004), são peptidil-prolil-cis/trans isomerasas e estão envolvidas em diversos sistemas biológicos que afetam a função e a estrutura de proteínas-alvo. Membros da família FK506 mostraram regular o crescimento e participar da transdução de sinal em mamíferos e plantas. Essa família de genes compartilha algumas de suas funções básicas, tanto em plantas quanto em animais, enquanto que outras funções são únicas em cada espécie (Breiman e Camus, 2002).

Pérez-Pérez et al. (2004), descreveram quatro alelos recessivos do gene *UCU2* e identificaram que esse gene é requerido para o crescimento e desenvolvimento e participa da sinalização de auxina e brassinoesteróide. Este hormônio esteróide faz parte do grupo de sinais endógenos requeridos pela planta para seu crescimento, organogênese e controle de processos, tais como: expansão celular, diferenciação vascular, estiolamento, desenvolvimento reprodutivo, resposta ao estresse e atuam juntamente com a auxina no alongamento celular e produção de etileno (Sasse, 1990). Essas atividades estão

associadas com a ATPase (auxina indiretamente estimula a bomba de próton), com a síntese do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (Taiz e Zeiger, 1998), com a alteração na orientação dos microtúbulos (Mayumi e Shibaoka, 1995) e com modificações da parede celular (Zurek et al., 1994).

Estas modificações da parede foram relatadas no milho Saracura por Purcino (2001) que observou uma menor extensibilidade celular devido a alterações na plasticidade da parede celular provocada pelo cálcio. Isso levou a uma redução no crescimento das plântulas germinadas, apesar de não haver diferenças no índice mitótico entre plântulas germinadas com ou sem cálcio. A auxina deve se ligar a uma proteína receptora específica para elicitar a resposta celular. Os esteróides, em animal, por exemplo, ligam-se a proteínas receptoras citoplasmáticas e este complexo receptor-esteróide migra para o núcleo, onde exerce efeito na expressão gênica por se ligar em seqüências específicas do DNA (Taiz e Zeiger, 1998). Os esteróides sinalizadores em plantas levam a alterações na transcrição. Alternativamente, a resposta fisiológica é mediada provavelmente por mecanismos que devem ser similares à sinalização “não genômica” de esteróides em animais. Essa rota sinalizadora de esteróides pode estimular alterações no nível de mensageiros secundários, fluxo de íons e atividade de algumas quinases (Bishop e Koncz, 2002).

A ação da auxina pode depender da presença de transportadores de cálcio porque ela estimula a liberação do íon cálcio do citoplasma para o espaço extracelular, possivelmente ativando a bomba de cálcio na membrana. Além disso, a auxina pode afetar a saída de cálcio do vacúolo, através do tonoplasto para dentro do citossol (Taiz e Zeiger, 1998).

Os clones C12 e E10 apresentaram melhor alinhamento com a basigina humana com 99% de identidade (acesso nº BC009040.2, *e-value* 2e-57 e *score* 228). Definida como glicoproteína transmembrana da família das imunoglobulinas em humanos (Yoshida et al., 2000), esta proteína essencial para

transporte de proteínas para dentro do núcleo é constituída por simples resíduo de GlcNAc-O (*N*-acetil glicosamina ligado ao oxigênio). Nas plantas, o oxigênio é ligado a oligossacarídeo composto por cinco ou mais resíduos de açúcares, incluindo GlcNAc. Uma variedade de macromoléculas, incluindo proteínas regulatórias, histona, RNA polimerase, entre outras, são sintetizadas no citoplasma e seletivamente transportadas para dentro do núcleo. A maioria das proteínas destinada ao núcleo apresenta “marcadores” chamados de sinal de localização nuclear que direcionam tais proteínas até o núcleo. Estas proteínas movem-se para dentro ou para fora do núcleo através de poros no envelope nuclear que são formados pelo complexo do poro nuclear, que atravessam a membrana nuclear interna e externa (transmembrana). Este complexo é constituído por glicoproteínas. A importação de proteínas para o núcleo é controlada por vários mecanismos, como fosforilação e desfosforilação ou por estímulos ambientais, como luz, estresse e patógenos entre outros (Raikhel e Chrispeels, 2000). A basigina encontrada provavelmente está atuando, permitindo a entrada de proteínas como fatores de transcrição, por exemplo, que apresentam atividade no núcleo, mas são encontrados no citoplasma, para que ocorra a expressão de genes que respondem ao estresse hipóxico.

Os clones D11 e G11 apresentaram melhor alinhamento com a paracaspase humana (acesso nº AF316597, *e-value* 0.0 e *score* 884) apresentando 99% de identidade.

As caspases constituem uma classe de proteases Cis (proteínase específica-aspartato cisteinil) envolvidas com a morte celular programada (MCP) ou apoptose. Proteases cisteína e serina envolvidas na morte e na injúria celular podem ser induzidas por fatores abióticos, bióticos ou sinais de desenvolvimento da planta (Solomom et al., 1999). Diferentes espécies de proteases, solúveis ou ligadas à membrana são induzidas ou reprimidas durante

diferentes períodos de estresse anóxico e reoxigenação de raízes de plântulas de milho crescidas por 3 dias no escuro (Subbaiah et al., 2000).

Dois grupos de proteases Cis relacionados a caspase foram identificados: paracaspase (*H. sapiens*) e metacaspase. Os genes que codificam a metacaspase, que não estão presentes em animais e parecem pertencer a um ancestral comum caspase/paracaspase, foram identificados em plantas (Ameisen, 2002). Há numerosos exemplos de morte celular durante o desenvolvimento da planta, tais como morte durante formação de aerênquima, processo reprodutivo da planta, senescência foliar, desenvolvimento de endosperma, resposta a patógenos e resposta a uma variedade de fatores abióticos. As plântulas de milho exibem um processo de morte celular relacionado com o processo de adaptação em condições de hipoxia. Esta seletiva morte celular leva à formação de aerênquimas, não somente reduzindo a demanda do oxigênio, mas também aumentando a porosidade da raiz e facilitando a difusão do oxigênio.

Dantas et al. (2001) observaram que o cálcio reduziu em 40% a presença de espaços intercelulares na parte aérea e raiz de plântulas de milho *Saracura* submetidas a 24 horas de hipoxia. No entanto, o cálcio induziu o aumento na atividade da celulase em 50%, uma enzima que faz parte do sistema de morte celular programada (MCP) nas células no córtex da raiz, concluindo que a maior atividade desta enzima na presença do cálcio não resulta em maior desenvolvimento de espaços intercelulares. Isto ocorre porque o cálcio, quando depositado na parede celular, forma pectatos de cálcio e a protege, diminuindo o acesso das enzimas de degradação ao seu substrato (Vitorino et al., 2001). Embora os mecanismos de MCP em plantas sejam pouco esclarecidos, similaridades morfológicas e bioquímicas foram encontradas entre células de animais e de plantas sofrendo apoptose. Essas similaridades incluem a redução do citoplasma e do núcleo, a fragmentação do DNA e do núcleo e a liberação do citocromo *c* a partir da mitocôndria (Woltering et al., 2002). Em plantas, nem

todos componentes da cascata da MCP foram já demonstrados (Virolainen, et al., 2002), mas parecem ser influenciados pela liberação do citocromo *c* pela mitocôndria para o citossol (Ameisen, 2002). Em seus experimentos, Zhao et al. (1999) mostraram que o citocromo *c*, derivado de células animais, adicionado ao citossol de células de cenoura, levou à ativação de proteínas como a caspase. Estes relatos sugerem que a rota de MCP em células de plantas e animais é evolutivamente conservada.

Os clones D12 e E12 apresentaram 95% de identidade com a seqüência de milho (*Zea mays* L.) PCO078539 (acesso n° AY105735. 1, *e-value* e-173 e *score* 617), mas sua função é ainda desconhecida.

O clone E04 apresentou 99% de identidade com a dineína citoplasmática (cadeia pesada) humana (acesso n° NM-001376.2, *e-value* e-120 e *score* 438). Esta proteína pertence a um complexo protéico que atua dependente de microtúbulo. É composta por uma cadeia pesada contendo um domínio de ligação para trifosfato de adenosina (ATP) e para o microtúbulo, uma cadeia intermediária, uma família de cadeia intermediária leve e várias cadeias leves diferentes. Hidrolisa ATP e utiliza esta energia para se movimentar na direção da extremidade negativa do microtúbulo (Lawrence et al., 2001). Esta proteína, chamada de “motor molecular”, está envolvida em uma variedade de funções celulares, como o transporte de vesículas e organelas, dinâmica do citoesqueleto, morfogênese, crescimento polarizado, movimento celular, formação do fuso, movimento dos cromossomos e transdução de sinal. O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica que se reorganiza continuamente sempre que a célula altera a forma, divide - se ou responde ao ambiente (Greggi, 1999).

A associação dos microtúbulos com a membrana plasmática pode inibir o canal de cálcio dependente de voltagem e o rompimento da rede de microtúbulos ativa estes canais, enquanto que a estabilização do microtúbulo não exerce efeito algum sobre o canal. O potencial de membrana pode controlar

a associação dos microtúbulos com a membrana plasmática, indicando que componentes do citoesqueleto podem estar envolvidos na regulação do canal de cálcio durante o processo de transdução de sinal em plantas superiores (Thion et al., 1996). No presente trabalho, a dineína associada ao citoesqueleto provavelmente estaria influenciando a despolarização do canal de cálcio e, assim, promovendo um aumento deste elemento no citoplasma e sinalizando à célula para transcrição de genes necessários para sobrevivência do milho Saracura em condições de hipoxia. Uma outra hipótese seria a reorganização de organelas pela dineína, recrutando aquelas que estão envolvidas no processo de liberação de cálcio (mitocôndria e retículo endoplasmático) para locais que necessitam deste elemento.

Tem-se discutido que o canal de cálcio ativado pela despolarização traduz, geralmente, sinais relacionados a estresse, uma vez que a despolarização da membrana é comum em muitos estímulos, ocorre por diversos mecanismos e, provavelmente, aumenta o cálcio citossólico por toda a periferia celular. Em plantas, pouco se sabe sobre os motores moleculares. Alguns estudos recentes nas áreas de bioquímica, biologia celular, molecular e genética desses motores moleculares em plantas indicaram que estes estão envolvidos em diferentes mecanismos regulatórios e seu papel na divisão celular, expansão celular, fluxo citoplasmático, comunicação célula a célula e morfogênese começa a ser entendido. Análise da seqüência do genoma de *Arabidopsis* com domínio conservado do “motor” da família de quinesina e miosina indica a presença de cerca de 40 “motores moleculares”, cujas funções permanecem sem definição. As características estruturais de alguns “motores” em planta sugerem que o cálcio, por meio da calmodulina, exerça um papel chave na regulação da função de motores baseados em microtúbulo ou actina (Reddy, 2001).

Análise recente do genoma de *Arabidopsis* sugere que as Angiospermas não possuem o “motor dineína-microtúbulo”. No entanto, seqüências do genoma

do arroz (*Oryza sativa*) revelaram quatro cadeias pesadas da dineína, indicando que a aparente falta dessas seqüências em *Arabidopsis* não é uma característica geral da organização genômica de Angiospermas (King, 2002).

O clone F01 apresentou 100% de identidade com a basigina humana (acesso no BC009040. 2, *e-value* 3e-69 e *score* 268).

O clone H02 apresentou 100% de identidade com uma seqüência de DNA de *Z. mays parviglumis* (acesso nº AF131683, *e-value* 1e-21 e *score* 109), cuja função ainda não foi descrita na literatura.

A Figura 6 mostra a provável relação entre as proteínas encontradas na biblioteca de raiz de plântulas de milho submetidas a hipoxia sob a influência de cálcio. A mioglobina tem a função biológica de se ligar ao oxigênio e, sob baixa pressão deste elemento, transportá-lo para a mitocôndria. Em uma situação hipóxica, ocorre uma limitação da respiração aeróbica e, por isso, o gene que codifica a mioglobina seria superexpresso, na tentativa de transportar o oxigênio para a mitocôndria. Em alteração do ambiente (estímulos como luz, patógeno, estresse), ocorre um aumento do cálcio no citossol oriundo do apoplasto, do simplasto ou de organelas, como as mitocôndrias e retículos endoplasmáticos. Sob deficiência de oxigênio e aumento do cálcio, ocorre uma liberação do citocromo *c* ativando a via de morte celular programada da qual a paracaspase faz parte. Esta proteína está envolvida na senescência foliar, desenvolvimento de endosperma e na formação de aerênquima, sendo este um mecanismo de adaptação das plântulas sob condição anaeróbica.

Estudos anteriores realizados com o milho Saracura já demonstraram a formação de aerênquimas, reduzindo a demanda dos gases e melhorando a difusão destes. A proteína-ligante FK5036 está envolvida no crescimento, transdução de sinal, participa da sinalização de auxina e de brassinoesteróide. Este hormônio controla processos, tais como a expansão celular, a resposta a estresse e a produção de etileno que também está envolvido na formação de

aerênquima. O hormônio brassinoesteróide, quando se liga a um receptor, no caso a proteína ligante (receptor intercelular), torna-se ativo e é deslocado para o núcleo atuando na transcrição de genes relacionados a resposta a estresse anaeróbico provavelmente. As atividades deste hormônio estão associadas a alterações na orientação dos microtúbulos onde a dineína tem sítio de ligação.

A dineína, grande complexo de proteínas, apresenta sítio de ligação para ATP e para os microtúbulos. Ela hidrolisa o ATP e utiliza esta energia para transportar vesículas e organelas e está envolvida na dinâmica do citoesqueleto, na transdução de sinal, entre outras funções. Provavelmente, esta proteína está envolvida na organização de organelas, como mitocôndria ou retículo endoplasmático, para que estas possam liberar o cálcio em locais que mais necessitam deste elemento, já que sua atuação é local. O cálcio ativa as proteínas quinases dependentes de cálcio (PKDC) que fosforilam outras proteínas, como os fatores de transcrição. A basigina é uma glicoproteína transmembrana que faz parte da constituição do complexo do poro nuclear. Este complexo permite a passagem de proteínas do citossol para o núcleo e vice-versa. A entrada de proteínas para o núcleo é controlada por fosforilação, desfosforilação ou por estímulos ambientais como luz, estresse, patógenos entre outros e a PKDC fosforila a proteína alvo, no caso fator de transcrição, por exemplo, e este fator já ativado é importado para o núcleo atuando na transcrição de genes.

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.

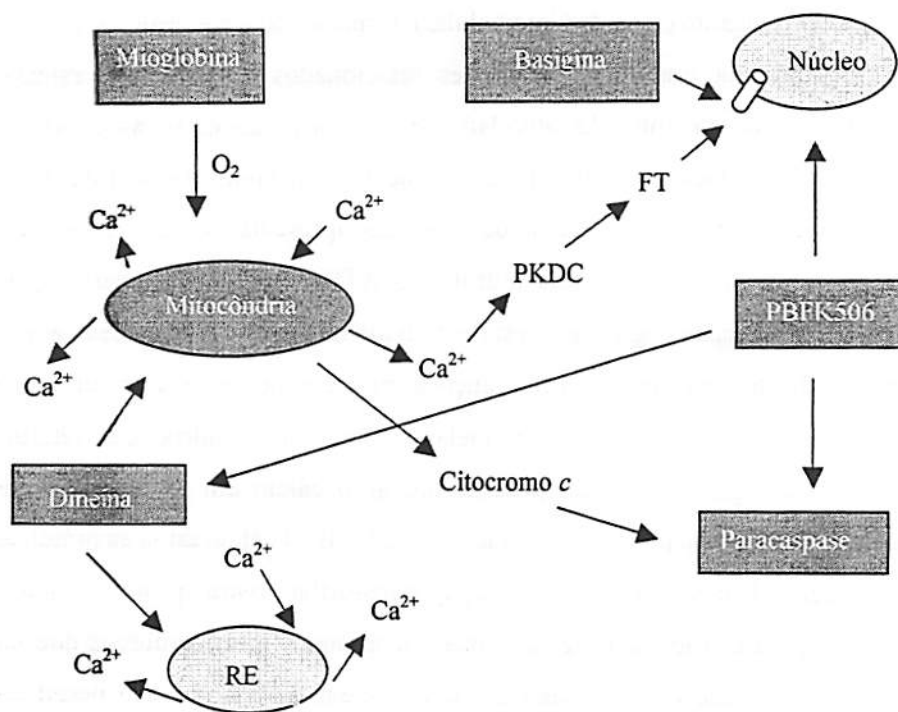


FIGURA 6. Representação da provável relação entre as proteínas codificadas pelos fragmentos dos genes obtidos na biblioteca subtrativa por supressão das raízes de plântulas de milho submetidas a hipoxia sob influência do cálcio.

Sete clones presentes nos ápices das raízes do milho Saracura ainda foram analisados (Tabela 2). O clone A02 apresentou 100% de identidade com glutationa S-transferase de *Ixodes ricinus* (acesso nº AY327034. 1, *e-value* 3e-05 e *score* 56). Esta proteína apresentou identidade com a seqüência depositada no GenBank com apenas 28 pares de base, por isso, devido à baixa cobertura, não foi analisada.

O clone B02 apresentou 97% de identidade com a seqüência referente ao gene de RNA ribossomal 25S do milho (*Z. mays* L.) (acesso nº AY108843. 1 no GenBank, *e-value* 1e-46 e *score* 192).

O clone B04 apresentou 95% identidade com *Z. mays* gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (acesso nº ZMU45857, *e-value* e-142 e *score* 513). A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPC) citossólica em milho é codificada por uma pequena família multigênica consistindo de *gpc1*, *gpc2*, *gpc3* e *gpc4*. Vários genes que codificam isoformas da mesma enzima são expressos diferencialmente nas células aeróbicas ou anóxicas devido a diferentes seqüências de seus promotores (Bray et al., 2000). Com base na identidade da seqüência deduzida de aminoácidos, as proteínas GAPC1 e GAPC2 (97% idênticas) foram designadas como grupo I, e GAPC3 e GAPC4 (99% idênticas) como grupo II. As proteínas GAPC3/4 são sintetizadas na raiz durante condições anóxicas e são conhecidas por serem polipeptídeos anaeróbicos. A expressão de *gpc3* ou *gpc4* não é afetada por estresse salino nem choque térmico. No entanto, a transcrição de *gpc1* e *gpc2* é constitutiva ou diminui em resposta a anoxia (Manjunath e Sachs, 1997). No presente trabalho, o gene expresso foi referente a *gpc 4*, expresso sob condições de estresse. Em diferentes condições ambientais, a expressão de três genes de GAPDH (*GapA*, *GapB* e *GapC*) em *Arabidopsis* é afetada diferencialmente. O nível de RNAm de *GapC* aumentou de cinco a dez vezes em plantas de *Arabidopsis* transferidas de condições de crescimento

normal para ambiente de choque térmico, anaeróbico ou de aumento do suplemento de sacarose. A expressão dos genes *GapA* e *GapB* não foi afetada nas condições de choque térmico ou aumento do suplemento de sacarose, mas aumentou cinco vezes sob anaerobiose.

Sob condições de estresse anaeróbico, as plantas dependem somente da glicólise para produção de ATP porque que a fosforilação oxidativa na mitocôndria é inibida. A regeneração do NAD^+ ou NADP^+ , que é catalisada por GAPDH e é requerida para continuidade da glicólise e produção de ATP, torna-se essencial na resposta anaeróbica. Por isso, diferentes genes são expressos nesta condição. O RNAm de *GapC* pode ser detectado em folhas, caule e raiz, com maior expressão em raiz (Yang et al., 1993).

O clone C02 apresentou 100% de identidade com a provável proteína (MtN3) de *Dianthus caryophyllus* (acesso nº AF151726, *e-value* $2e-06$ e *score* 60). Apesar de 100% de identidade e um *e-value* significativo, a seqüência que mostrou identidade com a seqüência depositada no GenBank é muito pequena, com cerca de 30 pares de base, apresentando baixa cobertura. Apesar desta proteína ser estudada por décadas, sua função em plantas ainda é pouco conhecida.

Metalotioneínas (Mt) são classes de proteínas-ligantes a metal como cobre, zinco, de baixo peso molecular, ricas em cisteínas. São divididas em duas classes, com base na seqüência de aminoácido. A classe I inclui mamíferos e classe II inclui plantas, fungos e alguns animais invertebrados (Guo et al., 2003). De acordo com o arranjo de resíduos de cisteína, as metalotioneína são classificadas em quatro tipos. Em *Arabidopsis*, sete genes foram identificados, incluindo estes quatro e, por isso, é utilizada como modelo usual para descrever esta proteína (Cobbett e Goldsbrough, 2002). Os quatro tipos são representados por *Mt1a*, *Mt2a*, *Mt2b*, *Mt3* e *Mt4*. Os genes *Mt1a* e *Mt2b* são expressos no floema de todos os órgãos e induzidos por cobre. *Mt2a* e *Mt3* são expressos na

célula do mesofilo e induzidos também pelo cobre em folhas jovens e ápice de raiz. A expressão do gene *Mt4* é restrita à semente. A expressão aumenta durante senescência foliar (Guo et al., 2003).

As diversas expressões dos diferentes genes *Mt* sugerem que as isoformas *Mt* de plantas podem diferir não somente pela seqüência, mas também nas funções exercidas nos tecidos específicos. A dificuldade de identificar uma metalotioneína provavelmente ocorre devido à instabilidade desta proteína na presença de oxigênio. Fragmentos peptídicos derivados dos genes *Mt1a*, *Mt2a*, *Mt2b* e *Mt3* de *Arabidopsis* foram identificados depois da purificação das proteínas sob condições anaeróbicas. A *Mt* participa de mecanismos para armazenar o zinco, que é requerido durante a germinação. A expressão de genes codificando *Mt* já foi observada no desenvolvimento de sementes. Esta proteína provavelmente está envolvida na acumulação e no estoque de metais na semente e, por isso, pode exercer importante papel na determinação da concentração de metais nos grãos. Devido à escassez de dados relacionados a esta proteína em plantas, utilizando como único modelo a *Arabidopsis* e devido à existência de uma diversidade de tipos, fica quase impossível definir sua função. No entanto, existe a hipótese de a metalotioneína estar relacionada à tolerância ao metal e a homeostase (Cobbett e Goldsbrough, 2002).

No presente trabalho, as sementes foram germinadas por quatro dias e por isso, provavelmente, ocorreu um aumento na expressão do gene que codifica para a proteína *Mt*, uma vez que, na germinação, o zinco é requerido e essa proteína participa do mecanismo de armazenamento desse elemento. Um outro fator que poderia ter levado a um aumento da expressão do gene, seria a condição hipóxica provocada, o que pode facilitar a identificação desta proteína.

O clone D06 apresentou 97% de identidade com DNA genômico da espécie de arroz *O. sativa* (acesso nº AP004778. 2, *e-value* e-144 e *score* 517).

Os clones E01 e G03 apresentaram 100% de identidade com a seqüência do gene RNA ribossomal 25S do milho (*Zea mays* L.) (acesso nº AY108843. 1, *e-value* 7e-51 e 1e-46, *score* 206 e 234, respectivamente).

4.3 Análise por Southern blot

Esta etapa do trabalho teve por objetivo identificar no genoma do milho Saracura, regiões que apresentassem homologia com as seqüências de cDNA derivadas de RNAm isolados da raiz e ápice da raiz influenciados pelo cálcio em condições de hipoxia. Como algumas seqüências dos genes de raiz do milho Saracura apresentaram identidade com genes de *H. sapiens*, foi feita uma análise utilizando-se da metodologia de Sourthern para a confirmação de que esses genes estavam realmente presentes no DNA do milho. Foram escolhidos cinco cDNAs, como sonda, provenientes de raiz, que apresentaram identidade no programa Blast N com mioglobina, dineína, basigina, paracaspase e proteína ligante FK506. Como controle positivo, utilizou-se a sonda gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase do milho, presente no material proveniente do ápice da raiz do milho Saracura.

A digestão do DNA genômico do milho Saracura foi completa (Figura 7) e os resultados obtidos com a sonda, utilizada como controle positivo, demonstraram a presença de forte sinal, confirmando a presença deste gene no milho e a eficiência do “kit Alkphos” (Figura 8). Entre os clones cujas seqüências foram similares às de humano, a proteína ligante FK-506 apresentou sinal intenso, confirmando sua presença na raiz da plântula. O sinal apresentado pelas outras sondas foi fraco, no entanto, foi possível confirmar a presença destas seqüências no milho Saracura.

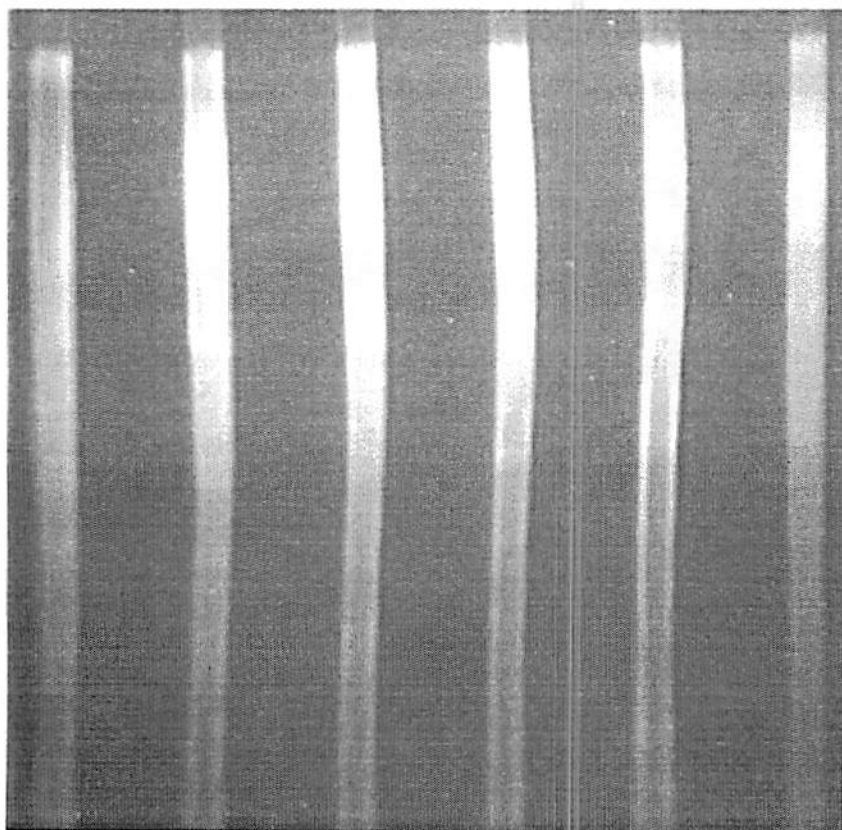


FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA do milho Saracura digerido com *EcoRI* e *BamHI*. UFLA, Lavras, MG, 2003.

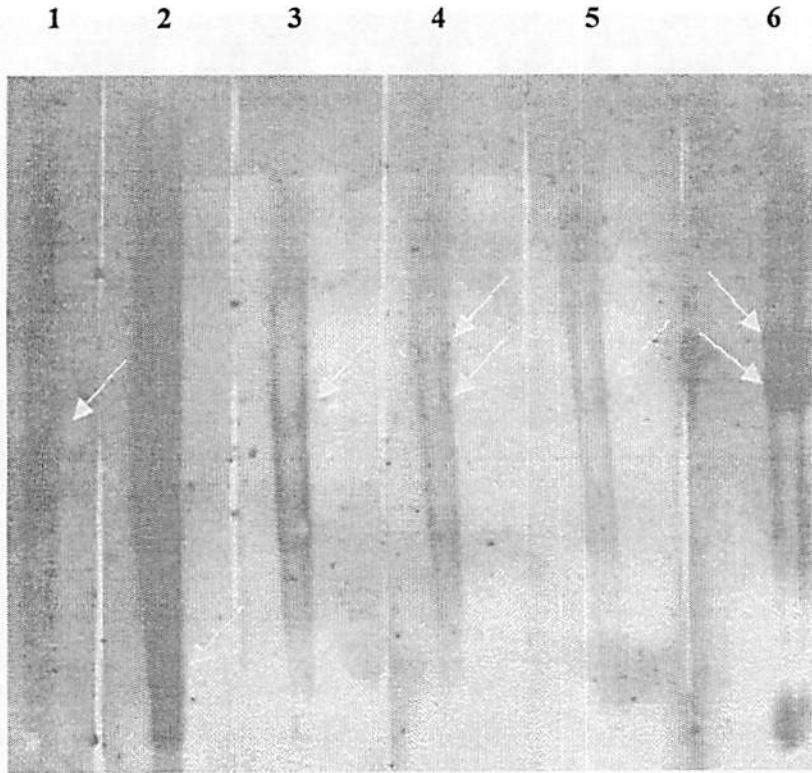


FIGURA 8. Resultado da hibridação dos clones com o DNA genômico do milho Saracura, utilizando o kit "Alkphos". Linhas 1 a 5 referem-se aos clones obtidos da biblioteca de raiz e linha 6 refere-se ao clone obtido da biblioteca do ápice de raiz do milho Saracura. Linha 1: mioglobina, linha 2: proteína-ligante FK506, linha 3: dineína, linha 4: basigina, linha 5: paracaspase, linha 6: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. As setas indicam as bandas hibridadas pela sonda. UFLA, Lavras, MG, 2003.

5 CONCLUSÃO

A técnica de hibridação subtrativa por supressão detectou genes expressos diferencialmente sob hipoxia, influenciados pelo cálcio. Dentre as proteínas codificadas, pode-se citar:

- 1- a mioglobina, que provavelmente transporta oxigênio para 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;
- 2- a dineína, que provavelmente ativa os canais de cálcio ou atuam no recrutamento de organelas, que acumulam cálcio, para locais que mais necessitam deste elemento;
- 3- paracaspase que, fazendo parte da rota de morte celular programada, promove a formação de aerênquima, por exemplo, para difusão do oxigênio;
- 4- proteína-ligante FK506, que pode ser um receptor de hormônio que atua na transcrição de genes ou atua na via de transdução de sinal;
- 5- gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, requerido pela planta para reposição de ATP pela rota glicolítica;
- 6- genes do projeto de mapeamento do genoma de milho que, apesar da função não revelada ainda, podem ser genes importantes que estão atuando na maior sobrevivência da planta ao estresse hipóxico influenciado pelo cálcio.

Esses genes poderão ser transferidos para outras variedades de milho de interesse econômico, por meio de transformação.

Os resultados encontrados dão suporte para os trabalhos já realizados anteriormente com esta variedade de milho na UFLA, na linha de fisiologia vegetal e anatomia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; OLIVEIRA, L. E. M.; VITORINO, P. F. P. G. Mecanismos de tolerância de plantas ao alagamento. *Universa*, Brasília, v. 8, p. 221-242, 2000.

AMEISEN, J. C. Origin and evolution of programmed cell death. *Cell Death Differentiation*, London, v. 9, n. 4, p. 367-393, Apr. 2002.

ARMSTRONG, W. Aeration in higher plants. *Advances in Botanical Research*, New York, v. 7, p. 223-332, 1979.

BISHOP, G. J.; KONCZ, C. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *The Plant Cell*, Rockville, v. 14, n. 12, p. 97-110, Dec. 2002.

BRAY, E. A.; SERRES, J. B.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Estados Unidos: American Society of Plant Physiologists, 2000. Cap. 22, p. 1158-1203.

BREIMAN, A.; CAMUS, I. The involvement of mammalian and plant FK506-binding proteins (FKBPs) in development. *Transgenic Research*, Dordrecht, v. 11, n. 4, p. 321-335, Aug. 2002.

CAMACHO, P.; LECHLEITER, J. D. Increased frequency of calcium waves in *Xenopus laevis* oocytes that express a calcium ATPase. *Science*, Washington, v. 260, n. 5105, p. 226-229, Apr. 1993.

CLONTECH LABORATORIES. *Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit User Manual*. 1997.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. B. Phytochelatins and metallothioneins roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, v. 53, p. 159-182, 2002.

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

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.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F. C.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 93, n. 12, p. 6025-6030, June 1996.

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.

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

DREW, M. C.; HE, C. J.; MORGAN, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science*, Oxford, v. 5, n. 3, p. 123-127, Mar. 2000.

ELLIS, M. H.; DENNIS, E. S.; PEACOCK, W. J. Arabidopsis roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. *Plant Physiology*, Lancaster, v. 119, n. 1, p. 57-64, Jan. 1999.

FRIES, D. D. Comportamento de α -amilase/ invertase e mudanças anatômicas associadas ao cálcio exógeno no período de germinação e/ou alagamento de plântulas do milho (*Zea mays* L.) "Saracura" – BRS-4154. 2003. 44 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GOUVÊA, J. A. Crescimento inicial e sobrevivência do milho (*Zea mays* L.), cv. Saracura BR 154, em condições de alagamento. 2001. 33 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GREGHI, C. M. Citoesqueleto. Dez. 1999. Disponível em: <<http://www.terravista.pt/bilene/5547/biologia/Celula/Citoes13.htm>>. Acesso em: 21 de novembro de 2003.

GUO, W. J.; BUNDITHYA, W.; GOLDSBROUGH, P. B. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. **New Phytologist**, Cambridge, v. 159, n. 2, p. 369-381, Aug. 2003.

GURSKAYA, N. G.; DIATCHENKO, L.; CHENCHIK, A.; SIEBERT, P. D.; KHASPEKOV, G. L.; LUKYANOV, K. A.; VAGNER, L. L.; ERMOLAEVA, O. D.; LUKYANOV, S. A.; SVERDLOV, E. D. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 240, n. 1, p. 90-97, Aug. 1996.

JAKEN, S. Protein kinase C isozymes and substrates. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 8, n. 2, p. 168-173, Apr. 1996.

KIEGLE, E.; GILLIHAM, M.; HASELOFF, J.; TESTER, M. Hyperpolarization-activated calcium currents found only in cells from the elongation zone of *Arabidopsis thaliana* roots. **The Plant Journal**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 225-229, Jan. 2000.

KING, S. M. Dyneins motor on in plants. **Traffic**, Copenhagen, v. 3, n. 12, p. 930-931, Dec. 2002.

LAWRENCE, C. J.; MORRIS, N. R.; MEAGHER, R. B.; DAWE, R. K. Dyneins have run their course in plant lineage. **Traffic**, Copenhagen, v. 2, n. 5, p. 362-363, May 2001.

LEHNINGER, A. L. **Biochemistry**. 2. ed. New York: Worth Publishers, 1993. 1013 p.

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.

MAYUMI, K.; SHIBAOKA, H. A possible double role of brassinolide in the reorientation of cortical microtubules in the epidermal cells of Azuki bean epicotyls. **Plant Cell and Physiology**, Kyoto, v. 36, n. 1, p. 173-181, Jan. 1995.

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.

MIEDEMA, H.; BOTHWELL, J. H. F.; BROWNLEE, C.; DAVIES, J. M. Calcium uptake by plant cells – channels and pumps acting in concert. **Trends in Plant Science**, London, v. 6, n. 11, p. 514-519, Nov. 2001.

NISHIZUKA, Y. Protein kinase and lipid signaling for sustained cellular responses. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, n. 7, p. 484-496, Apr. 1995.

PALMGREN, M. G.; HARPER, J. F. Pumping with plant P-type ATPases. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 883-893, June 1999. Supplement.

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.

PURCINO, R. P. Efeito fisiológico do cálcio na germinação e crescimento inicial de plântulas de milho da variedade BRS-4154 e sua relação com o aumento da tolerância ao alagamento. 2001. 40 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RAIKHEL, N.; CHRISPEELS, M. J. Protein sorting and vesicle traffic. In **BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry & molecular biology of plants.** Estados Unidos: American Society of Plant Physiologists, 2000. Cap. 4, p. 160-201.

REDDY, A. S. Molecular motors and their functions in plants. **International Review of Cytology**, New York, v. 204, p. 97-178, 2001.

ROBERTS, J. K. M.; HOOKS, M. A.; MIAULLIS, A. P.; EDWARDS, S.; WEBSTER, C. Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 98, n. 2, p. 480-487, Feb. 1992.

RUTTER, G. A.; BURNETT, P.; RIZZUTO, R.; BRINI, M.; MURGIA, M.; POZZAN, T.; TAVARE, J. M.; DENTON, R. M. Subcellular imaging of intramitochondrial Ca^{2+} with recombinant targeted aequorin: significance for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5489-5494, May 1996.

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. n. p.

SANDERS, D.; PELLOUX, J.; BROWNLEE, C.; HARPER, J. F. Calcium at the crossroads of signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 401-417, 2002. Supplement.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SASSE, J. M. Brassinolide – induced elongation and auxin. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 80, n. 3, p. 401-408, Nov. 1990.

SCHUSSLER, E. E.; LONGSTRETH, D. J. Aerenchyma develops by cell lysis in roots and cell separation in leaf petioles in *Sagittaria lancifolia* (Alismaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 83, n. 10, p. 1266-1273, Oct. 1996.

SHELP, B. J.; BOWN, A. W.; McLEAN, M. D. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, n. 11, p. 446-452, Nov. 1999.

- SNEDDEN, W. A.; ARAZI, T.; FROMM, H.; SHELPS, B. J. Calcium/Calmodulin activation of Soybean glutamate decarboxylase. *Plant Physiology*, Lancaster, v. 108, n. 2, p. 543-549, June 1995.
- SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *The Plant Cell*, Rockville, v. 11, n. 3, p. 431-443, Mar. 1999.
- 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. Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension cultured cells. *The Plant Cell*, Rockville, v. 6, n. 12, p. 1747-1762, Dec. 1994.
- SUBBAIAH, C. C.; BUSH, D. S.; SACHS, M. M. Mitochondrial contribution to the anoxic Ca^{2+} signal in maize suspension-cultured cells. *Plant Physiology*, Lancaster, v. 118, n. 3, p. 759-771, Nov. 1998.
- SUBBAIAH, C. C.; KOLLIPARA, K.; SACHS, M. M. A Ca^{2+} -dependent cysteine protease is associated with anoxia-induced root tip death in maize. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 51, n. 345, p. 721-730, Apr. 2000.
- 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.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1998. 792 p.
- 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.
- VANTOAL, T. T.; SAGLIO, P.; RICARDO, B.; PRADET, A. Developmental regulation of anoxic stress tolerance in maize. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, v. 18, n. 8, p. 937-942, Aug. 1995.

VARTAPETIAN, B. B.; ANDREEVA, I. N.; GENEROZOVA, I. P.; POLYAKOVA, L. I.; MASLOVA, I. P.; DOLGIKH, Y. I.; STEPANOVA, A. Y. Functional electron microscopy in studies of plant response and adaptation to anaerobic stress. *Annals of Botany*, London, v. 91, p. 155-172, Jan. 2003. Supplement.

VIROLAINEN, E.; BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. Ca²⁺-induced high amplitude swelling and cytochrome *c* release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress. *Annals of Botany*, London, v. 90, n. 4, p. 509-516, Oct. 2002.

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

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

WEBB, T.; ARMSTRONG, W. The effects of anoxia and carbohydrates on the growth and viability of rice, pea and pumpkin roots. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 34, n. 142, p. 579-603, 1983

WOLTERING, E. J.; BENT, A. V. D.; HOEBERICHTS, F. A. Do plant caspases exist?. *Plant Physiology*, Lancaster, v. 130, n. 4, p. 1764-1769, Dec. 2002.

YANG, Y.; KWON, H. B.; PENG, H. P.; SHIH, M. C. Stress responses and metabolic regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, Lancaster, v. 101, n. 1, p. 209-216, Jan. 1993.

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, July 2000.

ZHAO, Y.; JIAN, Z. F.; SUN, Y. L.; ZHAI, Z. H. Apoptosis of mouse liver nuclei induced in the cytosol of carrot cells. *FEBS Letters*, Amsterdam, v. 448, n. 1, p. 197-200, Apr. 1999.

ZHAO, Y.; KAPPER, B.; FRANKLIN, R. M. Gene structure and expression of an unusual protein kinase from *Plasmodium falciparum* homologous at its carboxyl terminus with the EF-hand calcium-binding proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 35, p. 4347-4354, Dec. 1993.

ZUREK, D. M.; RAYLE, D. L.; McMORRIS, T. C.; CLOUSE, S. D. Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 104, n. 2, p. 505-513, Feb. 1994.