

**EXPRESSÃO DE GENES SOD e PG EM
MILHO BRS 4154 SUBMETIDO À HIPOXIA
NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CÁLCIO**

BRENDA NEVES PORTO

2010

BRENDA NEVES PORTO

**EXPRESSÃO DE GENES SOD e PG EM MILHO BRS 4154 SUBMETIDO
À HIPOXIA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CÁLCIO**

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

Orientador
Prof. Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

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

Porto, Brenda Neves.

Expressão de genes SOD e PG em milho BRS-4154 submetido a hipoxia na presença e ausência de cálcio / Brenda Neves Porto. – Lavras : UFLA, 2010.

44 p. : il.

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

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. Milho Saracura. 2. Mesocótilo. 3. Parede celular. 4. Tolerância ao alagamento. 5. PCR em tempo real. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 574.88

BRENDA NEVES PORTO

**EXPRESSÃO DE GENES SOD e PG EM MILHO BRS 4154 SUBMETIDO
À HIPOXIA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CÁLCIO**

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2010

Dr. Paulo César Magalhães

Embrapa Milho e Sorgo

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

Prof. Dr. José Donizeti Alves
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Dedico este trabalho a minha mãe, que sempre me incentivou e apoiou em todos os momentos da minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me iluminar e me dar forças para que eu pudesse superar os obstáculos e finalizar este trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia vegetal, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fapemig, pelo apoio financeiro ao nosso projeto.

Ao Setor de Fisiologia Vegetal, onde foi montada a primeira parte do experimento.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular, onde foram desenvolvidas as atividades laboratoriais.

Ao Laboratório de Anatomia e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, onde foram realizadas análises para enriquecer meu trabalho.

Ao prof. Dr. José Donizeti Alves, pela orientação, confiança, apoio e amizade.

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

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

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pelos conhecimentos transmitidos em suas aulas teóricas e práticas.

Aos funcionários, Tanham, Lena, Joel, Odorêncio, Tina, Lamartini, Ana Carolina, Magda, Joice e Eula pela amizade, ajuda e convivência.

Aos colegas e amigos de laboratório, Alessandro, Anderson, Douglas, Léo, Lilian Fialho, Lilian Mayumi, Marlúcia, Neidiquele e Paôla pela amizade, convivência e apoio técnico.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, em especial aos meus amigos Cássia, Christiane, Danielle, Felipe, Gabriel, Horllys, Humberto, Kátia, Luciana e Luís Gustavo.

Às amigas do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Kamila, Meline e Solange pela amizade, convivência e auxílio.

As minhas grandes amigas Fabiana, Glacy e Nádia pela amizade, convivência, auxílio e companheirismo.

Aos meus amigos da graduação, que mesmo distantes me deram força e torceram por mim.

A minha família, em especial minha mãe, que sempre me deu força e apoio em todos os momentos da minha vida.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Milho	4
2.2 Milho BRS 4154 (Saracura)	5
2.3 Parede celular	6
2.4 Estresse oxidativo	7
2.5 Tolerância do milho BRS 4154 (Saracura) à hipoxia	10
2.6 Atuação do cálcio no aumento da tolerância do milho BRS 4154 (Saracura) à hipoxia	13
2.7 PCR em tempo real	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Local	17
3.2 Material vegetal	17
3.3 Germinação e indução à hipoxia	17
3.4 Anatomia	18
3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	19
3.6 Extração de RNA	20
3.7 Tratamento com DNase	21
3.8 Síntese cDNA	21
3.9 Desenho dos <i>primers</i>	22
3.10 PCR em tempo real (qRT-PCR)	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24

4.1 Influência do cálcio na germinação das plântulas de milho BRS 4154 (Saracura).....	24
4.2 Influência do cálcio na sobrevivência das plântulas de milho BRS 4154 (Saracura) submetidas à hipoxia.....	25
4.3 Influência do cálcio na anatomia das plântulas de milho BRS 4154 (Saracura) submetidas à hipoxia	27
4.4 Expressão quantitativa relativa dos genes PG e SOD no mesocótilo das plântulas de milho BRS 4154 (Saracura) submetidas à hipoxia	31
5 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ADH	Desidrogenase alcoólica
APX	Ascorbato peroxidase
CAT	Catalase
cDNA	Ácido desoxirribonucleico sintetizado a partir do ácido ribonucléico
cm	Centímetro
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
DEPC	Dimetil pirocarbonato
DHAR	Dehidroascorbato redutase
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase/	RNase Endonucleases
dNTP	Deoxirribonucléico trifosfato
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAA	Fomaldeído Ácido Acético e Álcool
FTIR	Espectro de infravermelho com transformação
GL	Gay-Lussace
g	grama (unidade de peso) / gravidade (centrífuga)
GR	Redutase da Glutaciona
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
L	Litro
LDH	Lactato desidrogenase
LiCl	Cloreto de Lítio

M	Molar (unidade de molaridade)
mg	Miligrama
mg.L-1	Miligrama por litro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mRNA	RNA mensageiro
N ₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Forma reduzida do NAD ⁺
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	Centro Nacional de Informações em Biotecnologia
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
1O ₂	Oxigênio singlete
OH [*]	Radical hidroxila
pH	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDC	Piruvato descarboxilase
PE	Pectina esterase
PG	Poligalacturonase
pH	Concentração de prótons
PVC	Cloreto de polivinila
p/v	Peso por volume
qRT PCR	PCR em tempo real
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossômico

RPM	Rotações por minuto
RT PCR	Reação em cadeia da polimerase a partir da transcrição reversa
SOD	Superóxido dismutase
SUSY	Sacarose sintase
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico de transferência
t/ha	Tonelada por hectare
U	Unidade
v/v	Volume por volume
XET	Xiloglucano endotransglicosilase

RESUMO

PORTO, Brenda Neves. **Expressão de genes SOD e PG em milho BRS 4154 submetidos à hipoxia na presença e ausência do cálcio**. 2010. 44 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os níveis de expressão dos genes SOD e PG, em plântulas de milho BRS 4154 (Saracura), relacionados com o seu mecanismo de tolerância à hipoxia, na presença e ausência de cálcio, por meio de PCR em Tempo Real. A germinação foi realizada em papel germitest embebidos em água ou solução de CaCl_2 (0,75% p/v), em câmara de germinação úmida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, por quatro dias. Após esse período, o alagamento foi realizado pela submersão das plântulas em tubos de PVC com tampão contendo ou não CaCl_2 (0,75% p/v), borbulhando-se nitrogênio gasoso por 3 minutos. Os tubos foram vedados e mantidos no escuro por quatro, cinco, seis e sete dias. Para os controles (não alagados), os rolos foram mantidos na câmara de germinação. Após cada período, parte dos mesocótilos foram coletados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C para análises moleculares, ao mesmo tempo outra parte foi acondicionada em FAA e para as análises anatômicas, e o restante foram fixados em Karnovsky para as análises de microscopia eletrônica de transmissão. A adição de cálcio exógeno retardou o aparecimento da constrição no mesocótilo, prolongando a sobrevivência. Esse aspecto foi observado na microscopia fotônica pelo retardamento no aparecimento de aerênquimas na região do mesocótilo em relação às amostras sem esse cátion no tampão de alagamento. Sendo, nesse caso, a origem do aerênquima esquizógena. Os dados relativos à microscopia eletrônica de transmissão mostraram a total desestruturação da parede celular após seis dias de hipoxia na ausência de cálcio. No entanto, a presença do cálcio contribuiu para a manutenção da integridade da parede celular em mesocótilos de plântulas submetidas a sete dias de hipoxia. Paralelamente, nessa fase a expressão do gene PG por PCR em Tempo Real foi mais elevada devido à parede celular ainda se apresentar intacta, e conseqüentemente disponibilizar substrato suficiente para essa enzima. Na ausência do cálcio o pico da expressão dessa enzima foi numa fase anterior, devido ao aparecimento precoce da constrição. Tanto na presença do cálcio quanto na ausência a expressão do gene SOD ocorre possivelmente porque o produto desse gene atua no sequestro de radicais livres formados em períodos de estresse mais intenso.

* Comitê Orientador: José Donizeti Alves – UFLA (Orientador), Paulo César Magalhães – Embrapa Milho e Sorgo, Luciano Vilela Paiva – UFLA

ABSTRACT

PORTO, Brenda Neves. **Expression of SOD and PG genes in BRS 4154 maize submitted to hypoxia in presence and absence of calcium**. 2010. 44 p. Dissertation (Master in Plant Biotechnology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

The present work aimed to evaluate the expression levels of SOD and PG genes, in maize plantlets BRS 4154 (Saracura), related with tolerance to hypoxia mechanism, in presence and absence of calcium, using Real Time PCR. The germination was realized in germitest paper embebed in water or CaCl₂ (0,75% w/v), in wet germination chamber at 25 ± 2°C, in dark, during four days. After this period the flooding was realized by plantlet submersion in PVC tubes with buffer containing or not CaCl₂ (0,75% w/v), bubbling with gaseous nitrogen during 3 minutes. The tubes were closed and kept in dark for four, five, six and seven days. The controls (without flooding) the rolls were kept in germination chamber. After each period, part of the mesocotyls were collected in liquid nitrogen and stored in freezer at -80°C for molecular analysis, and simultaneously the other part were maintained in FAA for anatomical analysis, and the remaining were fixed in Karnovsky for the transmission electronic microscopy. The addition of exogenous calcium retarded the constriction appearing in the mesicotyl, extending the survival. This aspect was observed in optical microscopy by the delay of aerenchym appearing in the mesocotyl region in relation to samples without this cation in flooding buffer. In this situation the aerenchym origin was esquizogen. The results related to electronic transmission microscopy showed a total desestruturation of cell wall after six days of hypoxia without calcium. Although the calcium presence contributed to maintain the cell wall integrity in mesocotyls submitted to seven days of hypoxia. Concomitantly, in this phase the expression of PG gene by Real Time PCR was higher due the cell wall still show intact, and consequently disponibilize enough substrate for this enzyme. In the absence of calcium the peak of the expression occurred in a previous phase, due the early appearing of the constriction. In both presence and absence of calcium, the SOD expression occur possibly because the product of this gene is responsible to scavenge the free radicals formed in the period of more intense stress.

* Guidance Committee: José Donizeti Alves – UFLA (Major Professor), Paulo César Magalhães – Embrapa Milho e Sorgo, Luciano Vilela Paiva – UFLA

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L) é uma espécie que pertence à família *Poaceae*, conhecida como família das gramíneas. É considerado o único cereal nativo do Novo Mundo, sendo a espiga mais antiga datada de 7.000 a.C, encontrada no vale do Tehucan, na região onde hoje se localiza o México. Desde então, o homem promoveu a adaptação e domesticação desse cereal por meio da seleção visual no campo, considerando importantes características, como por exemplo, produtividade e resistência a doenças originando, assim, as diversas variedades conhecidas hoje (Ranere et al., 2009).

Cada região do planeta possui suas próprias características climáticas, devido à grande diversidade de ambientes. Sendo assim, as características do solo e o regime de chuvas, quanto à drenagem, compactação e constituição, podem levar à formação de áreas nas quais a água se acumula por períodos prolongados no solo e ainda aquelas que permanecem alagadas (Pereira et al., 2008). O planeta possui cerca de 6% de suas áreas continentais sujeitas ao alagamento temporário e aos efeitos desse estresse. Só o Brasil possui cerca de 28 milhões de hectares de solos de várzea (solos aluviais e hidromórficos), sendo que 12 milhões estão localizados na região dos Cerrados e 500 mil hectares somente no Estado de Minas Gerais (Magalhães et al., 2008).

A baixa pressão de oxigênio nos solos promovida pelo alagamento é um dos estresses ambientais que reduzem o crescimento e a produtividade da cultura do milho. Entretanto, existem cultivares que apresentam certa tolerância à hipoxia, seja por mecanismos bioquímicos e fisiológicos, alterações morfológicas ou na expressão de genes, desviando o metabolismo para a via anaeróbica (Dantas et al., 2001; Ferrer et al., 2004).

O milho é considerado uma cultura sensível à hipoxia ou anoxia, o que torna seu cultivo inadequado em regiões que apresentem excesso temporário de

água no solo (Purcino, 2001). Com essa preocupação e com a possibilidade da rotação de culturas com milho em planícies de inundação e zonas úmidas, o Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo desenvolveu por meio de seleção fenotípica, uma variedade de milho conhecida como BRS 4154 (Saracura), que é capaz de sobreviver, produzir e tolerar o alagamento temporário do solo (Ferreira et al., 2008).

Com o objetivo de prolongar o tempo de exposição de plantas à hipoxia, tem sido utilizadas aplicações exógenas de cálcio (Subbaiah et al., 1994; Dantas et al., 2001; Gouvêa, 2001; Purcino, 2001; Vitorino et al., 2001; Fries et al., 2007). Estudos realizados anteriormente, pelos grupos Fisiologia Vegetal/Universidade Federal de Lavras e Embrapa Milho e Sorgo, mostraram que o fornecimento de cálcio exógeno, durante o período de germinação, prolongou a sobrevivência das plântulas de milho BRS 4154 (Saracura), retardando a degradação da parede celular, a qual foi apontada como sendo a causa primária da morte precoce dessas plântulas quando submetidas à hipoxia (Vitorino et al., 2001; Dantas et al., 2001).

Posteriormente, Gouvêa (2001), em estudos de caracterização da tolerância desse milho ao alagamento, observou que a adição de cálcio aumenta a sobrevivência das plântulas quando submetidas ao alagamento, mas reduz o desenvolvimento das mesmas. Segundo Purcino (2001), essa redução no crescimento dessas plântulas, em presença do cálcio, foi atribuída à extensibilidade celular por não haver diferenças no índice mitótico entre as plântulas germinadas na ausência e na presença desse elemento.

Diante da escassez de estudos moleculares envolvendo o milho BRS 4154 (Saracura), este trabalho foi desenvolvido baseado nos aspectos fisiológicos e anatômicos já conhecidos dessa variedade e com o objetivo de analisar os níveis de expressão de alguns genes (PG e SOD), relacionados com o

seu sistema de tolerância à hipoxia, na presença e ausência de cálcio, por meio de PCR em Tempo Real.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Milho

O milho, *Zea mays* L., é uma gramínea pertencente à família *Poaceae*, que possui sete gêneros, dos quais dois são nativos do hemisfério ocidental (*Zea* e *Tripsacum*) e cinco da Ásia. Originário da América Central, o milho corresponde ao único cereal nativo do Novo Mundo. Sua domesticação começou em torno de 6.000 a 10.000 anos atrás, a partir de uma gramínea selvagem (Teosinte) na região onde hoje se situa o Sul do México (Després et al., 2003; Doebley, 2004; Panaud, 2009).

Como resultado das seleções natural e artificial para a adaptação desse cereal às diferentes condições ecológicas, o homem conseguiu obter dos povos mais antigos em torno de 300 variedades de milho. Nesse contexto, adiciona-se ainda a diversidade de variedades intra-raciais e a enorme quantidade de genes identificados, tornando o milho a espécie botânica de maior diversidade genética existente na natureza (Ranere et al., 2009).

Devido ao seu alto valor nutricional, composição química e potencial de produção, o milho é um dos mais importantes cereais cultivados no mundo, ocupando a terceira posição, abaixo apenas do trigo e do arroz. Além disso, ele é considerado uma das espécies mais eficientes na conversão de energia radiante em biomassa, devido à sua grande capacidade de acumulação de fotoassimilados (Baldo, 2007).

Segundo levantamento brasileiro da safra de grãos 2009/2010, divulgado pela Conab, a área com a primeira safra de milho 2009/2010 está estimada em 8.281,0 mil hectares, com produção estimada de 32.347,3 mil toneladas, com redução de 3,9% em relação à safra passada (CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, 2010). Quanto à produção mundial de milho, estima-se que ela atinja quase 805 milhões de toneladas. O Brasil é o terceiro maior produtor de

milho, precedido pelos Estados Unidos e pela China (FAO - Food And Agriculture Organization, 2009).

A maior parte do consumo de milho no Brasil é destinada à produção de ração para alimentar aves e suínos (IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2006). Na indústria, é utilizado largamente na produção de elementos espessantes, colantes e óleos. Recentemente, a Europa e EUA tem incentivado seu uso para produção de etanol. Na alimentação humana, o milho é comumente empregado na forma *in natura*, como milho verde; e na forma de subprodutos, como pão, farinha e massas (Pinazza & Alimandro, 1998).

2.2 Milho BRS 4154 (Saracura)

O Brasil possui cerca de 28 milhões de hectares de solos de várzea (solos aluviais e hidromórficos), sendo que 12 milhões estão localizados na região dos Cerrados e 500 mil hectares somente no Estado de Minas Gerais (Magalhães et al., 2008). Esses solos de várzea resultam de alagamentos periódicos que ocorrem na época das chuvas ou das cheias dos rios (Andrade et al., 1999).

O alagamento é provocado tanto por fatores naturais, tais como, elevação dos níveis dos rios, ação de tempestades, cheias periódicas e drenagem inadequada do solo, quanto por fatores antrópicos, como o excesso de irrigação (Kozłowski, 1997). Esse encharcamento do solo leva à redução das trocas gasosas entre a planta e a atmosfera, uma vez que a difusão dos gases é 10000 vezes mais lenta na água do que no ar (Armstrong, 1979). Essa situação provoca um decréscimo da concentração de oxigênio no meio, gerando um ambiente hipóxico (ausência parcial de oxigênio) ou anóxico (ausência total de oxigênio) ao redor da raiz (Jacson & Drew, 1984).

Nessas condições, fica impossível manter o metabolismo aeróbico e a produção de energia suficiente para que a planta cresça adequadamente

(Kozlowski, 1997), gerando alterações em seu crescimento e desenvolvimento (Crane & Davies, 1988). Outros processos afetados são a nutrição mineral, a produção e translocação de reguladores de crescimento, a fotossíntese, a respiração, a alocação de carboidratos, prejudicando a produtividade de várias culturas comerciais implantadas em solos de várzea. Assim, dependendo da duração e intensidade do estresse causado pela baixa concentração de oxigênio, a planta pode até ser levada à morte (Kawase, 1987).

O milho é considerado uma cultura sensível à hipoxia ou anoxia, pelo fato de não apresentar mecanismos de tolerância a essas condições, o que torna seu cultivo inadequado, em regiões que apresentem excesso temporário de água no solo (Purcino, 2001). Visando oferecer estratégias alternativas para a resolução desse problema, a Embrapa Milho e Sorgo, iniciou em 1986 o desenvolvimento de um composto de ampla base genética pela recombinação de 36 populações de milho, cujo objetivo era criar uma variedade capaz de suportar períodos temporários de encharcamento do solo, característica inexistente nas cultivares de milho disponíveis no mercado brasileiro. No décimo segundo ciclo, ou seja, após 12 anos de estudos, essa variedade foi lançada comercialmente sob a sigla BRS 4154, milho ‘Saracura’ e atualmente se encontra no 18º ciclo de seleção (Parentoni et al., 1995). Essa variedade apresenta ciclo precoce, altura da planta em torno de 235 cm, altura da espiga 132 cm, produtividade média de 5 a 6,5 t/ha, ótima resistência ao acamamento e quebraimento, grão do tipo semi-duro, cor laranja (Parentoni et al., 1997).

2.3 Parede celular

A parede celular é considerada o componente mais resistente dos tecidos vegetais. É considerada por Carpita (1998), um compartimento dinâmico que ao longo da vida da célula pode sofrer alterações. É constituída por uma parede primária formada na fase de crescimento durante a divisão celular que ao longo

da expansão celular aumenta sua área rapidamente, uma parede secundária formada após cessar o crescimento celular pela diferenciação de várias células no interior da parede celular primária e uma lamela média rica em pectato de cálcio, presente na junção das paredes de células vizinhas (Taylor, 2008).

Os constituintes da parede celular primária e da lamela média podem ser classificados em vários tipos de moléculas poliméricas, como por exemplo, celulose, hemicelulose, polissacarídeos pécnicos e proteínas, os quais variam em conteúdo e estrutura química dependendo da espécie e do estágio de desenvolvimento. De modo simplificado, a celulose tem a função de conferir rigidez e resistência, já as hemiceluloses e as substâncias pécnicas conferem elasticidade e plasticidade (Taylor, 2008).

Inouhe & Nevins (1997) observaram em paredes celulares de coleótilos de milho que elas são constituídas por arabinose, xilose e glicose. A proporção de glicose, com o aumento da idade desses coleótilos teve um aumento enquanto os níveis de arabinose e xilose decresceram.

A parede celular é essencial para a maioria dos processos de crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução. Sendo também responsável por dar resistência mecânica às estruturas vegetais, promover a junção das células vizinhas, atuar como exoesqueleto controlando a forma das células e protegê-las contra agressões físicas e químicas (Taylor, 2008).

2.4 Estresse oxidativo

A baixa pressão de oxigênio nos solos promovida pelo alagamento é um dos estresses ambientais que reduzem o crescimento e a produtividade da cultura do milho, uma vez que esse cereal é classificado como não tolerante a essa condição. Ainda assim, existe cultivares que apresentam certa tolerância à hipoxia, o que tem sido atribuído à presença de diferentes mecanismos bioquímicos e fisiológicos, tais como fechamento estomático e também

alterações morfológicas, por formação de raízes adventícias e aerênquima no mesocótilo e nas raízes, além da alteração na expressão de genes que desvia o metabolismo para a via anaeróbica (Dantas et al., 2001; Ferrer et al., 2004). No que se refere aos polipeptídeos, a maioria deles foi identificada como enzimas, cuja síntese é regulada em nível transcricional e pós-transcricional (Chang et al., 2000).

Um dos efeitos mais pronunciados do déficit de oxigênio está relacionado ao acúmulo celular de radicais livres, que passam a ser prejudiciais ao organismo quando ocorre aumento excessivo na sua produção ou diminuição de agentes antioxidantes. Entende-se que radical livre seja um átomo, ou um grupo de átomos, com elétrons não pareados na última camada eletrônica, e são intermediários ou produtores de reações enzimáticas, principalmente na respiração e na fotossíntese (Rice-Evans et al., 1991). O oxigênio tem papel importante na produção desses radicais livres, dando origem às chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) que são mais frequentes nos processos de estresse oxidativo. Entre as principais EROs destacam-se o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singleto (1O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (Pastori & Foyer, 2002). Sob condições fisiológicas normais, há produção de EROs, porém as plantas possuem mecanismos que as mantêm em níveis reduzidos (Scandalios, 1993). Entretanto sua produção é aumentada em decorrência de vários tipos de estresse, como, por exemplo, a hipoxia. A falta de oxigênio interfere diretamente na respiração e no transporte de elétrons, ocorrendo a paralisação da fosforilação oxidativa e redução da carga energética. Consequentemente, haverá um acúmulo de poder redutor (NADH), que aliado à baixa carga energética e à saturação da cadeia de transporte de elétrons, favorece a formação das EROs (Vantoi, 1989).

Em plantas, está bem caracterizado que, sob condições de alagamento do solo, ocorre um aumento descontrolado de radicais livres nas células. De

acordo com Blokhina et al. (2003), o acetaldeído, normalmente acumulado sob essa condição estressante, pode funcionar como doador de elétrons ativando o $O_2^{\cdot-}$ que, ao sofrer dismutação pela ação da dismutase do superóxido (SOD), forma H_2O_2 , cujo nível (desintoxicação) é regulado pela catalase, por diversas peroxidases e pelo ciclo ascorbato-glutationa.

Para sobreviverem a esse tipo de estresse as plantas desenvolveram sistemas de remoção das EROs a partir do sistema antioxidante enzimático, caracterizado pelo aumento na atividade de enzimas antioxidantes, que incluem a Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, como a Ascorbato peroxidase (APX), Dehidroascorbato redutase (DHAR) e Glutationa redutase (GR) (Jiménez et al., 1998).

A SOD é a primeira enzima que faz parte do sistema antioxidante sendo considerada uma enzima chave por remover o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e controlar outras EROs. Essa enzima está presente em todos os compartimentos celulares susceptíveis ao estresse oxidativo (Bowler et al., 1992). Segundo estudos de Yan et al. (1996), a atividade da SOD em folhas de milho aumentou no primeiro dia de alagamento quando os níveis de $O_2^{\cdot-}$ eram elevados, o que se explica pelo fato dessa enzima ser induzida pelo substrato.

Além de ter baixo rendimento energético, a via anaeróbica produz substâncias tóxicas, como etanol e ácido lático. Dessa forma, os mecanismos de tolerância das plantas à baixa disponibilidade de oxigênio podem estar relacionados com a formação de aerênquimas e raízes adventícias, assim como a expressão de genes responsáveis pela síntese de enzimas do metabolismo de carboidratos (Fries et al., 2007).

Durante a anoxia, o piruvato produzido pela glicólise é inicialmente fermentado a lactato. A produção de prótons pela glicólise e outras rotas metabólicas, assim como o decréscimo da translocação de prótons através da membrana plasmática e tonoplasto levam a uma diminuição do pH citossólico.

Com valores mais baixos de pH, a atividade da lactato desidrogenase (LDH) é inibida e a piruvato descarboxilase (PDC) é ativada, aumentando também a atividade do álcool desidrogenase (ADH), conduzindo a um aumento na produção de etanol e um decréscimo na produção de lactato. A indução da ADH, por consumir o piruvato e reciclar o NAD^+ , permite a manutenção da glicólise. A rota de fermentação de etanol consome mais prótons que a rota do lactato, fazendo com que o pH citossólico aumente, acentuando assim a capacidade da planta sobreviver sob anoxia (Ricard et al., 1994). A acidificação do citoplasma é um dos maiores determinantes da intolerância à deficiência de oxigênio (Drew, 1997).

2.5 Tolerância do milho BRS 4154 (Saracura) à hipoxia

Desde seu lançamento comercial, muitos autores, estudando essa variedade, verificaram que sua taxa de sobrevivência em condições de alagamento é superior à variedade BR 107, sensível ao alagamento. Quando as taxas do BR 107 foram próximas de zero, a taxa da variedade ‘Saracura’ foi de 73% após quatro dias de estresse (Vitorino et al., 2001). E quando comparada a uma variedade dos Estados Unidos tolerante ao alagamento mostrou que sua taxa de sobrevivência é duas vezes superior à do milho norte-americano (Alves et al., 2002).

Somente a partir do quarto dia de alagamento, as plântulas da variedade BRS 4154 (Saracura) apresentaram queda em sua sobrevivência, quando foi possível observar, na região do mesocótilo, um aspecto translúcido, com intensa lise celular. Com o prolongamento do estresse, as plântulas tornaram-se flácidas, formando nessa região uma forte constrição, responsável pelo tombamento e morte das mesmas. Esses sintomas também foram observados precocemente na variedade BR 107, sugerindo que essas características são o primeiro sinal de irreversibilidade dos danos causados pela hipoxia (Vitorino et al., 2001). Saab &

Sachs (1996) observaram em seus estudos que esse déficit de oxigênio provoca um desarranjo dos componentes da parede celular.

Para que as plantas sobrevivam em um ambiente hipóxico, causado pelo encharcamento temporário do solo, elas sofrem uma série de mudanças, as quais são mencionadas por vários autores, como formação de raízes adventícias superficiais (Kolb et al., 1998; Zeng et al., 1999) e de aerênquima (He et al., 1994), síntese e ativação de enzimas como desidrogenase alcoólica e síntese da sacarose (Andrews et al., 1994; Guglielminetti et al., 1995) e hipertrofia de lenticelas (Kolb et al., 1998).

O aerênquima é um tecido parenquimático especializado onde se desenvolvem grandes espaços intercelulares preenchidos por gases que se estendem por todo tecido (Mauseth, 1988). Essa estrutura pode ter origem esquizógena, quando surge por separação da parede celular ao longo da lamela média, ou origem lisígena, quando surge por lise celular programada de maneira constitutiva ou em resposta a um estímulo ambiental (Kawase, 1979; Schussler & Longstreth, 1996; Kawai et al., 1998).

Segundo Mc Pherson (1939), a causa primária do desenvolvimento desses espaços intercelulares é atribuída ao colapso das células corticais decorrentes da perda de turgidez celular. Contudo, hoje se sabe que a hipoxia estimula a produção de etileno que, por sua vez, provoca a indução de enzimas que atuam no metabolismo de parede celular, culminando na formação dos aerênquimas.

Aerênquimas de origem esquizógena são formados por enzimas, como a xiloglucano endotransglicosilase (XET), que atuam no afrouxamento da parede celular (Saab & Sachs, 1996). Já os aerênquimas de origem lisígena são identificados por restos de parede celular no tecido (Kawase, 1979). De acordo com He et al. (1996) a celulase faz parte de um complexo sistema envolvido na morte programada de células. Observa-se então, que a atividade máxima dessa

enzima coincide com a formação de aerênquima (Kawase, 1979), sendo totalmente perdida após a completa degradação da parede celular (Panavas et al., 1998). Esses autores não descartam, porém, o envolvimento de outras enzimas degradativas de parede celular, como a poligalacturonase (PG) em estágios iniciais deste processo.

Dantas et al. (2001) em estudos com plântulas de milho BRS 4154 (Saracura) observaram a formação de espaços intercelulares tanto em raízes como na parte aérea, caracterizando os aerênquimas lisígenos. Esse fenômeno demonstra uma adaptação anatômica que favorece a sobrevivência dessas plântulas expostas à hipoxia, uma vez que permite a retenção e melhor distribuição dos gases ao longo de todo o tecido (Drew, 1997; Gunawardena, 2008).

Outra característica de grande importância para a adaptação de plantas em ambientes alagados é a porosidade das raízes. Parentoni et al. (1995) concluíram que a tolerância à hipoxia do ciclo 4 do milho BRS 4154 (Saracura) foi atribuída também ao aumento da porosidade da raiz. Adicionalmente, Pereira et al. (2008) relataram que essa porosidade nas raízes é um dos principais mecanismos que as plantas de milho utilizam quando se encontram em condições de baixa concentração de oxigênio no solo.

Em estudo de raízes do milho BRS 4154 (Saracura), Pereira et al. (2008) verificaram um aumento no diâmetro das células corticais ao longo dos ciclos de seleção. O aumento de tamanho foi relacionado à redução do número de camadas celulares corticais, com formação de maiores espaços intercelulares e uma difusão contínua de gases com o aerênquima formado, caracterizando aumento da porosidade da raiz.

O aparecimento de raízes adventícias também é outra adaptação importante, pois permite a manutenção da atividade metabólica oxidativa no

sistema radicular, uma vez que esse sistema apresenta níveis mais elevados de oxigênio (Pezeshki et al., 1996).

2.6 Atuação do cálcio no aumento da tolerância do milho BRS 4154 (Saracura) à hipoxia

Com o objetivo de prolongar o tempo de exposição de plantas à hipoxia, têm sido utilizados vários métodos, como por exemplo, aplicações exógenas de hormônios (Ellis et al., 1999), açúcares (Perata et al., 1997) e cálcio (Subbaiah et al., 1994; Dantas et al., 2001; Gouvêa, 2001; Purcino, 2001; Vitorino et al., 2001; Fries et al., 2007).

O cálcio é um elemento que está presente em muitos processos fisiológicos nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas e cuja atividade depende de sua localização e de sua concentração na célula. A função do cálcio como elemento estrutural, tem sido objeto de vários estudos, já que é o único elemento que apresenta atividade apoplástica (Selling et al., 2000). Esse íon participa das ligações covalentes entre os grupos carboxílicos dos ácidos poligalacturônicos dificultando a ação das enzimas de degradação (Damarty et al., 1984; Grant et al., 1973). Essa associação forma pectatos de cálcio, os quais atuam como cimento entre as células, conferindo maior firmeza aos tecidos vegetais. Dantas et al. (2001), Gouvêa (2001), Purcino (2001), Vitorino et al. (2001) e Fries et al. (2007), em trabalhos conduzidos na Universidade Federal de Lavras, mostraram que a adição de cloreto de cálcio ao papel de germinação e ao tampão de alagamento promoveu o aumento da sobrevivência das plântulas, tanto da variedade BRS 4154 (Saracura) como da BR 107. Na ausência do cálcio, o milho ‘Saracura’ suportou até dois dias de hipoxia, sem prejuízo na taxa de sobrevivência, no entanto, na presença do elemento sua sobrevivência aumentou para quatro dias. Para a variedade BR 107, observou-se uma queda na sua sobrevivência já no primeiro dia de estresse na ausência do cálcio. No entanto,

sua sobrevivência na presença do cálcio caiu lentamente durante todo o período experimental.

Outra função importante do cálcio na fisiologia das plantas é a sua atuação como mensageiro secundário nas diferentes condições de estresse (Hepler & Wayne, 1985; Smallwood et al., 1999). Em condições de deficiência de oxigênio, a variação na concentração citoplasmática desse elemento ativa genes que codificam para o metabolismo anaeróbico, como por exemplo, os genes da celulase e da desidrogenase alcoólica (Subbaiah et al., 1994; He et al., 1996). Existem relatos na literatura de que após dois minutos em condições de anoxia ocorre elevação na concentração de cálcio no citoplasma (Subbaiah et al., 1994), estimulando a produção de etileno, que por sua vez, ativa a síntese da celulase (He et al., 1996). Entretanto, estudos feitos por Dantas et al. (2001), mostraram que esse aumento na atividade da celulase em presença de cálcio não resultou em maior desenvolvimento de aerênquimas. Tal fato se explica pela menor disponibilidade desse elemento no substrato, uma vez que, quando depositado na parede celular, forma pectatos de cálcio, aumentando a estabilidade da matriz pectica e diminuindo sua vulnerabilidade ao ataque pela poligalacturonase (Lima, 1997).

O modelo mais aceito de ligação do cálcio aos ácidos poligalacturônicos é do tipo “egg box” (Burns & Pressey, 1987). A ligação do cálcio com a parede celular ocorre através de ligações iônicas dos grupos carboxílicos livres dos polímeros de ácidos urônicos na parede celular (Siddiqui & Bangerth, 1996; Saftner & Conway, 1998).

A aplicação de cálcio exógeno também tem estendido a vida de prateleira de alguns frutos como resultado de uma maior estabilidade da parede celular (Lima, 1997; Souza, 1998). A relação entre parede celular e cálcio explica a firmeza e o aumento da resistência dos frutos à invasão por microrganismos (Conway et al., 1995).

A presença do cálcio causa inibição do crescimento das plântulas que resulta da redução na divisão ou na alongação das células que ocorre devido a alterações na plasticidade da parede celular (Deuber, 1992). Segundo Purcino (2001), no milho BRS 4154 (Saracura), a redução no crescimento, em presença do cálcio, foi atribuída à extensibilidade celular por não haver diferenças no índice mitótico entre as plântulas germinadas na ausência e na presença desse elemento.

Após todos esses estudos, concluiu-se que o cálcio retarda a atividade de enzimas hidrolíticas nas plântulas de milho sob hipoxia, fazendo com que os sintomas de região translúcida e de constrição no mesocótilo, relacionados com o afrouxamento e degradação da parede celular, apareçam tardiamente na presença desse elemento.

2.7 PCR em tempo real

É uma ferramenta importante da biologia molecular que apresenta alta sensibilidade e reprodutibilidade, com tempo de análise relativamente curto. Além disso, apresenta um limite mínimo de quantificação que chega a 50 picogramas, e em alguns casos, atinge até 100 fentogramas (Fajardo et al., 2008).

Em plantas, essa técnica tem sido utilizada para determinar o número de inserções de T-DNA em plantas transgênicas (Yi et al., 2008), detectar a presença de organismos geneticamente modificados em alimentos (Hernandes et al., 2001), quantificar o nível de transcritos em órgãos vegetais (Lammers et al., 2001; Hernandez et al., 2001), estudar famílias de genes (Jang et al., 2004; Yokoyama et al., 2004) e verificar o perfil de expressão de proteínas envolvidas na transdução de sinais, como por exemplo, a família do gene CTR1 envolvida na sinalização do etileno (Adams-Phillips et al., 2004).

Yi et al. (2008) utilizaram com sucesso a técnica de PCR em tempo real para detectar o número de cópias de transgenes em algodão (*Gossypium hirsutum*).

Estudos com plantas transgênicas demonstram que a alteração na expressão gênica pode aumentar a tolerância das plantas, e, além disso, sinais de reconhecimento de estresse abiótico, rotas de transdução e ativadores da transcrição estão sendo elucidados, sendo que esses componentes iniciam e controlam a expressão de reações bioquímicas em vários pontos das rotas metabólicas. Aliada à técnica de transcrição reversa, a técnica de PCR em tempo real pode ser ferramenta útil na análise da expressão de genes relacionados ao estresse.

Em uma análise de PCR em tempo real é necessário ao menos um gene de referência endógeno, que dá um valor estimado da quantidade total do DNA na amostra, sendo que a amplificação de sequências específicas e sua quantificação relativa são baseadas nesses genes (Hernandes et al., 2001), que deverão possuir três requisitos: ser específico para a espécie, exibir baixo número de cópias e baixa heterogeneidade entre cultivares (Ding et al., 2004).

A quantificação de cDNA em tempo real pode ser alcançada através de sondas fluorogênicas ou por agentes intercalantes, como o SYBR Green (Gachon et al., 2004). A tecnologia SYBR Green apresenta simplicidade e custo relativamente baixo quando comparada às demais. É baseada no monitoramento do aumento da intensidade de fluorescência após cada ciclo de PCR, sendo que esse aumento na fluorescência se deve ao fato do SYBR Green se ligar a fitas duplas de DNA. Apresenta a vantagem de permitir a curva de fusão do DNA gerado, sendo que existem softwares para calcular a temperatura de fusão (T_m) do fragmento desejado após a PCR (Fajardo et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

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

Os cortes anatômicos e imagens de microscopia fotônica foram feitos no Laboratório de Anatomia Vegetal, no setor de Biologia, da Universidade Federal de Lavras.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram visualizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME), no departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras.

As atividades laboratoriais de biologia molecular foram desenvolvidas no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) também localizado na Universidade Federal de Lavras.

3.2 Material vegetal

Para a realização do presente trabalho, foram utilizadas plântulas de milho de BRS 4154 (Saracura), Ciclo 18, desenvolvida pela Embrapa Milho e Sorgo, a qual tolera períodos intermitentes de encharcamento do solo.

3.3 Germinação e indução à hipoxia

Vinte e cinco cariopses de milho tratadas com 1 g.L^{-1} do fungicida comercial CAPTAN 50% foram colocadas para germinar em rolos de papel germitest embebidos em água ou solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,75% (p/v). Os rolos permaneceram em câmara de germinação úmida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, por quatro dias.

Após esse período de germinação, as plântulas foram submersas em tampão de alagamento contendo Tris 5mM (trishidroximetilaminometano), 100 mg.L⁻¹ de ampicilina, pH 8 ajustado com HCl (Saab & Sachs, 1996) ou o mesmo tampão acrescido de CaCl₂ a 0,75% (p/v). Para isso, quatro rolos de papel de germinação foram colocados em tubos de PVC de 75 mm de diâmetro e 40 cm de altura, contendo 1,2 L do tampão. Para reduzir a pressão de oxigênio no tubo, tornando o ambiente hipóxico (3% v/v O₂ em N₂), fez-se borbulhamento com nitrogênio gasoso por 3 minutos (1 L.min⁻¹). Em seguida, os tubos foram vedados e mantidos no escuro por zero, quatro, cinco, seis e sete dias. No tratamento controle os rolos foram mantidos em câmara de germinação.

Em cada período, foram coletadas amostras da região do mesocótilo, colocadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer a -80°C para as análises moleculares. Ao mesmo tempo, amostras foram acondicionadas em FAA para as análises anatômicas ou fixadas em Karnovsky para as análises de microscopia eletrônica de transmissão.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por período de avaliação. Cada repetição era composta por 100 plântulas.

3.4 Anatomia

Para as análises anatômicas, os mesocótilos de milho foram fixados em FAA por 48 horas e posteriormente preservadas em etanol 70% GL para posteriores cortes transversais em sua região mediana utilizando micrótomo de mesa modelo LPC. Em seguida foi feita uma clarificação nesses cortes com hipoclorito de sódio 50% por aproximadamente 3 minutos. Logo após esses cortes foram lavados em água destilada, duas vezes, por 10 minutos. Na sequência, foi realizada a coloração dos cortes com uma solução chamada de safrablau composta por safranina 1% e azul de astra 0,1% na proporção de 7:3.

Novamente procedeu-se a lavagem com água destilada para montagem das lâminas semipermanentes com glicerina a 50%. A vedação das lâminas foi feita com resina de nitrocelulose (Kraus & Arduim, 1997).

As lâminas foram observadas em microscópio óptico Olympus BX 60 acoplado a uma câmara digital Canon A630, com a qual se fez as fotomicrografias.

3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para as análises em MET, os mesocótilos de milho foram fixados em Karnovsky (1965) modificado, [(Glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%)] durante 24 horas na geladeira. Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes por 10 minutos em tampão cacodilato 0,05 M e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% por uma hora. Em seguida foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%) por 10 minutos em cada um, sendo que no gradiente 100% foi feita desidratação por três vezes de 10 minutos. Após desidratação em acetona, foi realizada inclusão em resina inicialmente a 30% por 8 horas e, em seguida, resina 70%. Após 12 horas, as amostras passaram duas vezes por resina 100% por 24 horas cada vez, sendo o material colocado em molde adequado e conduzido para polimerização em estufa a 70°C por 48 horas. Após esse tempo, os blocos foram acertados em forma de trapézio de 1 mm de cada lado com auxílio de lâmina. Depois foram realizados cortes semifinos para identificação do material. Em sequência cortados em ultramicrotomo, as secções ultrafinas foram conduzidas para telinhas e procedeu-se a contrastação em acetato de uranila e citrato de chumbo (Bossola & Russell, 1998; Alves, 2004).

A observação dos espécimes foi realizada em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM 109, localizado no Laboratório de Microscopia

Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

3.6 Extração de RNA

Todos os materiais utilizados para extração foram tratados com solução diethylpirocarbonato (DEPC) a 0,5% para inativar RNAses.

Para isolamento do RNA foi utilizado como tecido vegetal mesocótilo de milho. O método de extração utilizado foi o Concert, realizado de acordo com manual: Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen), com algumas adaptações. Para cada microtubo contendo aproximadamente 100 mg de tecido macerado foram adicionados 500 µL do reagente Concert gelado (4°C) e homogeneizados em vórtex por 2 minutos. Em seguida, os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente, deixados horizontalmente para maximizar a extração do RNA. Após esse período, o material foi submetido à centrifugação por 5 minutos à temperatura de 4°C com velocidade de 12.000 g e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 300 µL de clorofórmio gelado e levados ao vórtex por 1 minuto para homogeneizar. Para separação das fases, as amostras foram submetidas à centrifugação durante 10 minutos a 4°C (12.000 g) e a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo. Em seguida, foi adicionado um volume equivalente à fase aquosa de isopropanol gelado (aproximadamente 550 µL) e os tubos foram homogeneizados por inversão. As amostras foram deixadas por 30 minutos no freezer a -20°C para precipitação e, logo após, foram centrifugadas por 25 minutos a 4°C (12.000 g). O sobrenadante foi descartado, o *pellet* lavado com 600 µL de etanol 75% gelado e os tubos foram submetidos à centrifugação por 5 minutos à temperatura de 4°C (12.000 g). O líquido residual foi removido dos tubos com a pipeta, os quais, ficaram em estufa à 24°C até secar. Em seguida, o

RNA foi ressuspensionado em 20 μL de água Milli-Q autoclavada e as amostras foram armazenadas no freezer a -20°C .

Para avaliar a integridade das amostras extraídas, o RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) corado com 1 μL de Brometo de Etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), posteriormente visualizado sob luz ultravioleta e a imagem captada pelo fotodocumentador EDAS 290 (Kodak[®]). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop[®] Espectrophotometer ND-1000) a A_{260} nm com o objetivo de determinar a quantidade e qualidade.

3.7 Tratamento com DNase

Todas as amostras foram tratadas com o kit Turbo DNA Free (Ambion[™]) em uma reação contendo 10 μg de RNA total, 1 U da enzima rDNaseI, 0,1 volume do tampão DNaseI 10 X e água livre de DNase/RNase para completar o volume de 50 μL . Essa reação foi incubada a 37°C por 30 minutos, em seguida adicionada 5 μL da enzima DNase inactivation para inativar DNase. As amostras foram incubadas por 2 min, centrifugadas a 10.000 g por 1,5 minutos e transferido o sobrenadante (50 μL) para novos tubos.

Para a avaliação da integridade das amostras tratadas, o RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) corado com 1 μL de Brometo de Etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), posteriormente visualizado sob luz ultravioleta e a imagem captada pelo fotodocumentador EDAS 290 (Kodak[®]). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop[®] Espectrophotometer ND-1000) a A_{260} nm com o objetivo de determinar a quantidade e qualidade.

3.8 Síntese cDNA

Para síntese do cDNA foi utilizado o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems[™]) Inicialmente, o RNA foi preparado a uma concentração de 1 μg em um volume final de 10 μL . Em seguida, foi preparado

um mix contendo 2 µL do tampão 10X da enzima, 0,8 µL do mix 25X dNTP (100 mM), 2 µL do primer RT Random Primers 10X, 1 µL *MultiScribe™* Reverse Transcriptase, e água para um volume final de 10 µL/amostra. Para cada solução preparada de 10 µL de RNA a 1 µg, foram acrescentados 10 µL desse mix. Os tubos foram submetidos ao termociclador Eppendorf Mastercycler gradient, programado com três etapas: 10 minutos a 25°C para o anelamento dos *primers*; 2 horas a 37°C para ação da enzima e 5 minutos a 85°C para inativá-la. Posteriormente, as amostras foram conservadas no freezer a -20°C.

3.9 Desenho dos *primers*

Os *primers* utilizados neste estudo para análise de qRT-PCR foram desenhados utilizando o programa “OligoPerfect™ Designer” (Invitrogen) (Tabela 1). Os genes ADH e UBI foram utilizados como controles endógenos constitutivos da reação.

TABELA 1 *Primers* utilizados na análise de qRT-PCR.

GENE	SEQUENCIA DO PRIMER	Amplicon (pb)
ADH F	5' AGGACGCTGAGTTAAGACC3'	104
ADH R	5' CACATTTGGCAGATCAGTGC3'	104
PG F	5' CTTCAAGAACTCGCCGTTTT3'	100
PG R	5' GGTGTTTGGCGAATTCAAAG3'	100
SOD F	5' GGTTTCATGAGCTTGAAGATGATTT3'	100
SOD R	5' CAGGCCAACAAACACCACAT3'	100
UBI F	5' AAGGCCAAGATCCAGGACAA3'	69
UBI R	5' TTGCTTTCCAGCGAAGATGA3'	69

(F) sequência do *primer forward*. (R) sequência do *primer reverse*.

3.10 PCR em tempo real (qRT-PCR)

Foi utilizado como *template* amostras de cDNA para análise da expressão gênica quantitativa através do ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems™), pelo sistema de detecção SYBR Green, o qual se baseia na capacidade intercalante desse fluoróforo às fitas duplas de cDNA.

Primeiramente foi realizado um ensaio de quantificação absoluta, onde foi determinada a melhor diluição apresentada para as amostras. Os cDNA foram diluídos 1:5, 1:10, 1:25, 1:50 e 1/100.

Após determinar a diluição 1:5 foi realizado o ensaio da expressão relativa, através do método do C_T comparativo. As amostras foram processadas em triplicatas com três repetições biológicas.

As condições térmicas da reação foram: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e finalizando com 1 segundo a 95°C. Os dados foram analisados no programa 7500 Fast Software (Versão 2.1). Para cada reação, foram utilizados 1 µL de cDNA, 0,2 µL de cada *primer* e 5,0 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™). A reação foi completada com 3,6 µL de água MilliQ autoclavada, para um volume final 10,0 µL/amostra.

Para o cálculo da expressão, primeiramente, cada amostra foi normalizada com a média dos controles endógenos, utilizando a equação $\Delta C_T = C_T(\text{gene alvo}) - C_T(\text{controle endógeno})$ e a quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$. A linha de corte (*Threshold*) foi definida manualmente.

Após serem analisados, os dados gerados pelo programa 7500 Fast Software (Versão 2.1) foram exportados para o programa Microsoft Excel, para realização dos cálculos de ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$ e da quantificação relativa (RQ) para a posterior construção dos gráficos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Influência do cálcio na germinação das plântulas de milho BRS 4154 (Saracura)

Observou-se que as plântulas submetidas a quatro dias de germinação, sob influência do cálcio, apresentaram redução em seu crescimento em comparação às plântulas germinadas na ausência desse elemento (Figura 1).

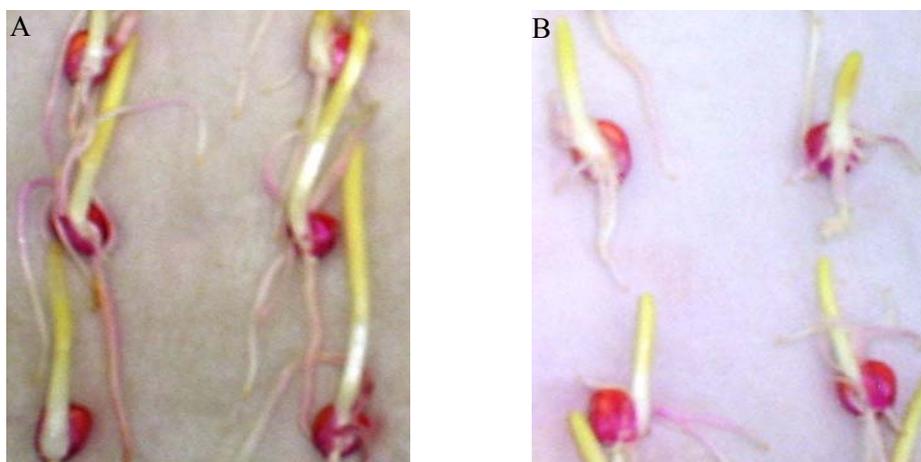


FIGURA 1 Aspecto geral de plântulas de milho BRS 4154 (Saracura) após a germinação. Plântulas germinadas na ausência (A) e presença (B) de cálcio.

Esse resultado foi primeiramente verificado por Gouvêa (2001), ao estudar a influência de diferentes soluções salinas na germinação de plântulas de milho. O autor observou reduções na ordem de 55% e 18% na presença de cálcio e de manitol respectivamente, sugerindo que essa redução possa ter ocorrido pelo fato do cálcio ser tanto um componente osmótico da própria solução quanto um elemento estrutural da parede celular. Purcino (2001) confirmou esse resultado, mostrando que o cálcio influencia diretamente no crescimento celular, sem, no entanto promover alterações na citocinese, uma vez que esse íon atua

como elemento estrutural diminuindo a extensibilidade celular. Fries et al. (2007) observaram que a adição da solução de cálcio ao papel de germinação reduziu o ganho de massa seca das plântulas de milho. 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 do segundo dia em diante. A partir do quinto dia, o crescimento foi semelhante, mantendo a diferença adquirida anteriormente.

Purcino (2001) também sugere que essa maior sobrevivência das plântulas de milho ‘Saracura’ germinadas na presença de cálcio, está relacionada a uma menor exportação de açúcares solúveis totais nos primeiros dias após a germinação, atrasando, com isso, o desenvolvimento dessas plântulas as quais conservam assim suas características embrionárias possuindo maior tolerância ao estresse. Isso tudo ocorre porque a substituição da água pelo cálcio na germinação leva a uma preservação das reservas na cariopse, comprometendo o crescimento das plântulas.

4.2 Influência do cálcio na sobrevivência das plântulas de milho BRS 4154 (Saracura) submetidas à hipoxia

Plântulas de milho alagadas na ausência de cálcio, somente sobreviveram por um período de seis dias. Na presença desse elemento, este período se estendeu para sete dias. Acima desses períodos, as plântulas sofreram queda acentuada na sua sobrevivência.

Aos seis dias nas duas condições, as plântulas apresentaram um aspecto translúcido, na região do mesocótilo, formado por uma aparente lise celular (Figura 2B e C). No primeiro caso, a região translúcida estava em estado bem avançado, as plântulas estavam muito flácidas, e havia também, uma forte constrição na região do mesocótilo translúcido, que foi responsável pelo tombamento e morte das mesmas (Figura 2B). Já na presença do cálcio, o aspecto translúcido do mesocótilo se encontrava ainda nos estádios iniciais de

formação (Figura 2C) e os demais eventos descritos, só ocorreram um dia depois, ou seja, aos sete dias de estresse. Esses resultados mostraram claramente que o cálcio retardou o desenvolvimento desta região translúcida, que é o primeiro sinal indicativo da irreversibilidade dos danos causados pela hipoxia.



FIGURA 2 Aparência do mesocótilo de plântulas de milho BRS 4154 (Saracura) submetidas a diferentes períodos de hipoxia. A: Mesocótilo normal (após germinação). B: Mesocótilo translúcido com constrição (seis dias sem cálcio). C: Mesocótilo translúcido (seis dias com cálcio). SETA PRETA: Mesocótilo. SETA LARANJA: Constrição.

Saab & Sachs (1996) durante estudo do envolvimento de enzimas no metabolismo de parede celular e suas relações com o desenvolvimento de aerênquima em plântulas de milho sob hipoxia observaram que essas plântulas desenvolviam zonas amolecidas no mesocótilo, as quais, evoluíam para toda a planta. Assim sendo, sugeriram que a baixa concentração de oxigênio no meio

provoca desarranjos dos componentes da parede celular, causados pela ação de genes induzidos por essa condição de estresse que é responsável pelo afrouxamento e degradação da parede celular. Vitorino et al. (2001) também observaram a presença desses mesmos sintomas e sugeriram que a aplicação de cálcio tanto na germinação quanto no tampão de alagamento, proporciona um aumento na sobrevivência das plântulas de milho BRS 4154 (Saracura) com nove ciclos de seleção. Para esses autores tal elemento retardou a lise celular no mesocótilo dessas plântulas, provavelmente pela manutenção da integridade da parede celular.

Corroborando aos resultados de Vitorino et al. (2001), Dantas et al. (2001) e Gouvêa (2001) atribuíram o aumento na sobrevivência das plântulas de milho BRS 4154 (Saracura) à presença de cálcio no tampão de alagamento, uma vez que esse elemento tem papel estrutural, conferindo maior resistência às paredes celulares. Consequentemente há redução de sintomas característicos de plântulas em baixa concentração de oxigênio, como a presença de constrição na região do mesocótilo, devido ao aumento na atividade de enzimas relacionadas ao afrouxamento e degradação da parede celular nessas condições.

No entanto, de acordo com Purcino (2001) a presença do cálcio induz uma maior tolerância ao alagamento porque mantém ativo o metabolismo de carboidratos, caracterizado em seu trabalho pela degradação do amido. Essa maior tolerância é caracterizada pela exportação de açúcares solúveis totais da cariopse e expressão de genes, cujos produtos, atuam diretamente como mantenedores do metabolismo anaeróbico.

4.3 Influência do cálcio na anatomia das plântulas de milho BRS 4154 (Saracura) submetidas à hipoxia

Antes do alagamento, não foi possível observar, independentemente do cálcio, aerênquimas na região do mesocótilo das plântulas (Figura 3A e 3B). Com o estresse hipoxico, foi possível observar, nessa região, aerênquimas aos

seis dias na ausência do cálcio (Figura 3C) e aos sete dias na presença desse elemento (Figura 3D). Neste trabalho, foi possível observar, que o aparecimento de aerênquimas na região do mesocótilo tem origem esquizógena, ou seja, surge a partir de um afinamento na espessura da parede celular.

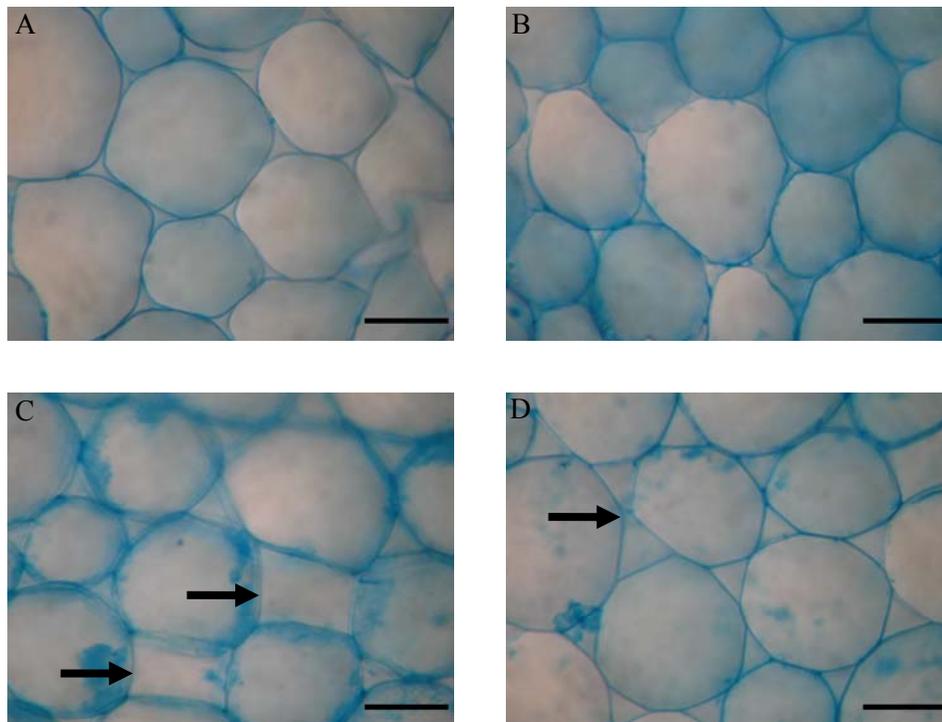


FIGURA 3 Formação de aerênquimas na região do mesocótilo de plântulas de milho BRS 4154 (Saracura) submetidas a diferentes períodos de hipoxia. A: Após germinação na ausência de cálcio. B: Após germinação na presença de cálcio. C: Seis dias de hipoxia na ausência de cálcio. D: Sete dias de hipoxia na presença de cálcio. Aumento de 40X. A barra preta corresponde a 50 μ m. Seta: Aerênquima.

De uma maneira geral, a formação de aerênquima nas raízes, é vantajosa em plantas que se desenvolvem em ambientes hipóxicos porque diminui a resistência de difusão de oxigênio entre os órgãos aerados e não aerados (Drew,

1997). Dessa maneira, mesmo que o ambiente externo esteja com baixa concentração de oxigênio, ou até mesmo anóxico, internamente o mesocótilo encontra-se aerado. Quando os aerênquimas não se desenvolvem, a quantidade de energia produzida é muito pequena, dificultando o desenvolvimento da planta e induzindo sua senescência precocemente (Yen & Yang, 1998). Entretanto, no presente caso, o desenvolvimento dessa estrutura na região do mesocótilo foi prejudicial, uma vez que provocou o tombamento e morte prematura das plântulas na ausência do cálcio.

A análise em microscopia eletrônica de transmissão revelou que a parede celular de mesocótilo de plântulas de milho germinadas na ausência de cálcio (Figura 4A) estava mais fina que aquelas germinadas na presença do elemento (Figura 4B). Observou-se também que a parede celular do mesocótilo de plântulas de milho alagadas por seis dias na ausência do cálcio, mostrou-se ainda mais estreita e totalmente desestruturada (Figura 4C). Este avançado estado de desestruturação da parede pode ter sido responsável pela formação da constrição na região do mesocótilo (Figura 2B) causando o tombamento e a morte das plantas. Nesse caso, é possível inferir que este estreitamento da parede celular enfraquece a parede celular e leva a um amolecimento naquela região que foi também observado por Saab & Sachs (1996) e Vitorino et al. (2001).

Com o cálcio presente no tampão de alagamento, foi constatado aos sete dias de estresse, um estreitamento da parede celular (Figura 4D) em relação ao controle (Figura 4B), porém sem a desestruturação detectada aos seis dias quando as plantas foram submetidas ao estresse na ausência deste íon (Figura 4C). Nesse caso, porém, foi observada nessa ocasião, a constrição na região do mesocótilo. Esses resultados mostram que o cálcio, retardou, por um dia, o aparecimento da constrição na região do mesocótilo mantendo as células ainda com suas paredes estruturadas. O aparecimento da constrição e o consequente tombamento das plântulas deram-se então, tão somente em função do

afinamento da parede celular. A função do cálcio como elemento estrutural, tem sido objeto de vários estudos, já que é o único elemento que apresenta atividade apoplástica (Selling et al., 2000). Esse íon participa das ligações covalentes entre os grupos carboxílicos dos ácidos poligalacturônicos dificultando a ação das enzimas de degradação (Damarty et al., 1984; Grant et al., 1973). Essa associação forma pectatos de cálcio, os quais atuam como cimento entre as células, conferindo maior firmeza aos tecidos vegetais.

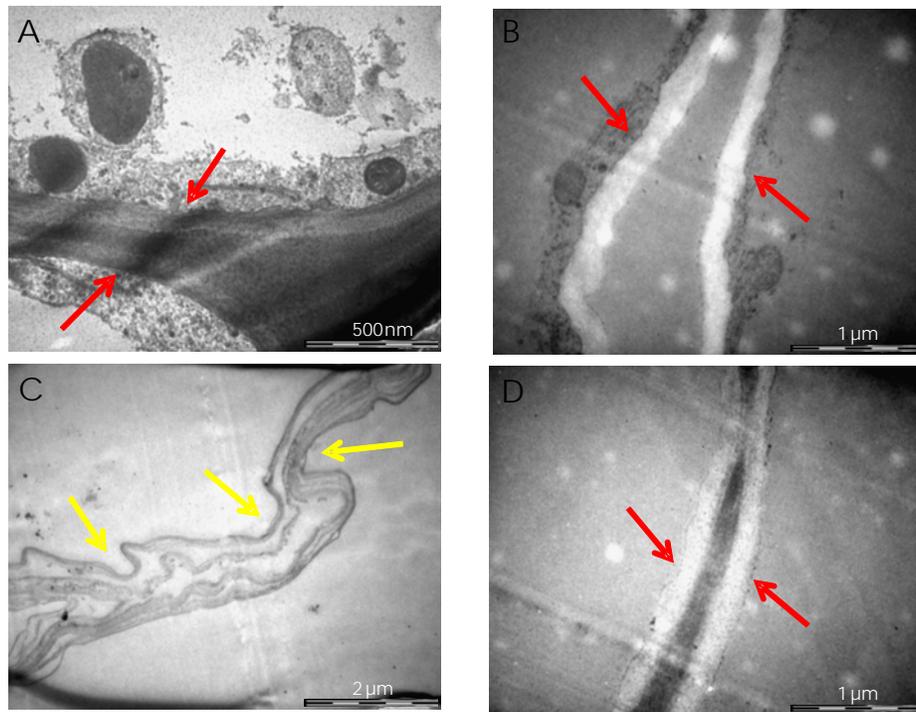


FIGURA 4 Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da parede celular de mesocótilos de plântulas de milho BRS 4154 (Saracura) submetidos a diferentes períodos de hipoxia. A: Após germinação na ausência de cálcio. B: Após germinação na presença de cálcio. C: Seis dias de hipoxia na ausência de cálcio. D: Sete dias de hipoxia na presença de cálcio. SETA AMARELA: Parede celular desestruturada. SETA VERMELHA: Parede celular rígida.

Esses resultados mostram que o milho ‘Saracura’, até o 18^o ciclo de seleção, continua reagindo de maneira eficaz à baixa disponibilidade de oxigênio no meio. Mostram também que a presença de cálcio, tanto na germinação quanto no tampão de alagamento retarda o aparecimento do aspecto translúcido e da constricção no mesocótilo prolongando a sobrevivência das plântulas a essa condição de estresse.

4.4 Expressão quantitativa relativa dos genes PG e SOD no mesocótilo das plântulas de milho BRS 4154 (Saracura) submetidas à hipoxia

Na presença do cálcio, as expressões dos genes PG e SOD na região do mesocótilo, ocorreram em níveis mais elevados que aqueles observados quando este elemento estava ausente, porém com o mesmo padrão (Figura 5). Em ambos os casos, foram altos antes do alagamento, caindo a seguir até cinco ou quatro dias, com e sem cálcio, respectivamente. A seguir, aumentou até o final das avaliações, aos sete dias para as plantas que estavam alagadas na presença de cálcio e seis dias para aquelas que estavam na ausência do elemento.

Logo após a germinação, independentemente do cálcio, os genes PG e SOD apresentaram altos níveis de expressão na região do mesocótilo (Figura 5). A enzima poligalacturonase, produto da expressão desse gene atua proporcionando maior flexibilidade para a parede celular o que permite o crescimento e desenvolvimento da plântula logo após a germinação da semente. Já a superóxido dismutase, enzima ligada ao estresse oxidativo que normalmente ocorre durante a germinação das plântulas em câmara úmida, atua sequestrando possíveis radicais livres formados nesse período.

Com a imposição da hipoxia, ocorreu uma queda acentuada na expressão desses genes aos cinco e quatro dias, nas plantas submetidas ao estresse na presença e ausência de cálcio, respectivamente. A seguir, a expressão desses genes voltou a aumentar até o final do período de avaliação, que se deu, respectivamente, aos sete e seis dias de estresse para as plantas com e sem cálcio.

(Figura 5). Já foi bem documentado que o prolongamento do estresse hipóxico aumenta a produção de radicais livres, que pode levar a morte precoce de plantas (Zanandrea et al., 2009). No caso presente, foi observado que o milho BRS 4154 (Saracura) conseguiu sobreviver por um dia a mais quando o cálcio estava presente no tampão de alagamento. Esta maior tolerância ao estresse hipóxico, possivelmente está ligado à alta expressão do gene SOD na região do mesocótilo dessas plantas. Nesse caso, a ativação do gene SOD possivelmente foi seguida pela síntese da enzima superóxido dismutase altamente ativa, que foi responsável por uma captura mais eficiente dos radicais livres fazendo com que as plântulas na presença do cálcio, sobrevivessem por mais tempo nessa condição.

A alta expressão do gene PG ao final do período de imposição da hipóxia, possivelmente levou à síntese da poligalacturonase, o que possibilitou a desestruturação dos componentes pécticos da parede celular. Esse fato confirma as observações de Vitorino et al. (2001) que mostraram a geração de substâncias de baixo peso molecular quatro dias após a hipóxia.

As análises de microscopia revelaram que aos seis dias de hipóxia na ausência do cálcio, já era possível observar na região do mesocótilo, uma região translúcida com uma forte constrição (Figura 2B), a presença de aerênquimas (Figura 3C) e células com paredes muito estreitas e altamente desestruturadas (Figura 4C). Na presença desse íon, a região translúcida também foi detectada aos seis dias de estresse, ainda que nos estádios iniciais de desenvolvimento (Figura 2C). Por outro lado, o aparecimento de aerênquimas naquela região, ocorreu um dia depois (Figura 3D) onde se observou células com parede celular bem estruturada, ainda que mais estreita que antes da imposição do estresse (Figura 4D).

O aumento da expressão do gene PG no mesocótilo aos seis dias de estresse, na ausência do cálcio (Figura 5), possivelmente levou à síntese de uma

enzima altamente ativa que, ao atuar sobre a parede celular, levou a sua desestruturação (Figura 4C) causando a morte das plântulas. Nessa mesma ocasião, o mesocótilo de plântulas de milho alagadas na presença do cálcio apresentou níveis mínimos de expressão do gene da PG. Esse fato pode explicar o aparecimento da região translúcida aos seis dias de estresse sem a constrição, uma vez que parede celular, apesar de mais fina, ainda se encontrava estruturada pelos efeitos positivos do cálcio na sua composição (Figura 4D). Por outro lado, com sete dias de estresse na presença do cálcio, quando já se podia observar nitidamente a região translúcida com a constrição do mesófilo, resultado do estreitamento da parede celular, a expressão do gene PG estava em níveis elevados (Figura 5). Esta ativação gênica gerou poligalacturonase ativa que provocou o afrouxamento e ao início de degradação da parede celular em níveis suficientemente fortes para causar a constrição na região, sem a desestruturação da parede celular que no caso, estava fortalecida pelo cálcio.

Embora a expressão do gene PG, na presença do cálcio, fosse aproximadamente 100 vezes maior do que na ausência, observa-se que ocorreu apenas um afinamento na parede celular, a qual se manteve estruturada. Esta estruturação da parede celular, possivelmente tenha ocorrido, devido ao restrito acesso da enzima, apenas nas cadeias lineares dos ácidos poligalacturônicos, que ficam na parte mais externa da parede celular. Isso acontece porque a aplicação de cálcio exógeno promove aumento tanto no nível desse elemento na parede celular, como no citosol (Subbaiah et al., 1994) e a maior concentração desse elemento no citosol provavelmente elevou a síntese das enzimas de parede celular induzidas pelo etileno. O cálcio quando depositado na parede celular, forma pectatos de cálcio, aumentando a estabilidade da matriz pectica e diminuindo sua vulnerabilidade ao ataque pela PG (Lima, 1997). Para haver a total desestruturação da parede celular, como ocorreu na ausência do cálcio,

deve ocorrer a atuação de outra enzima, a pectina metilesterase, nos pectatos de cálcio.

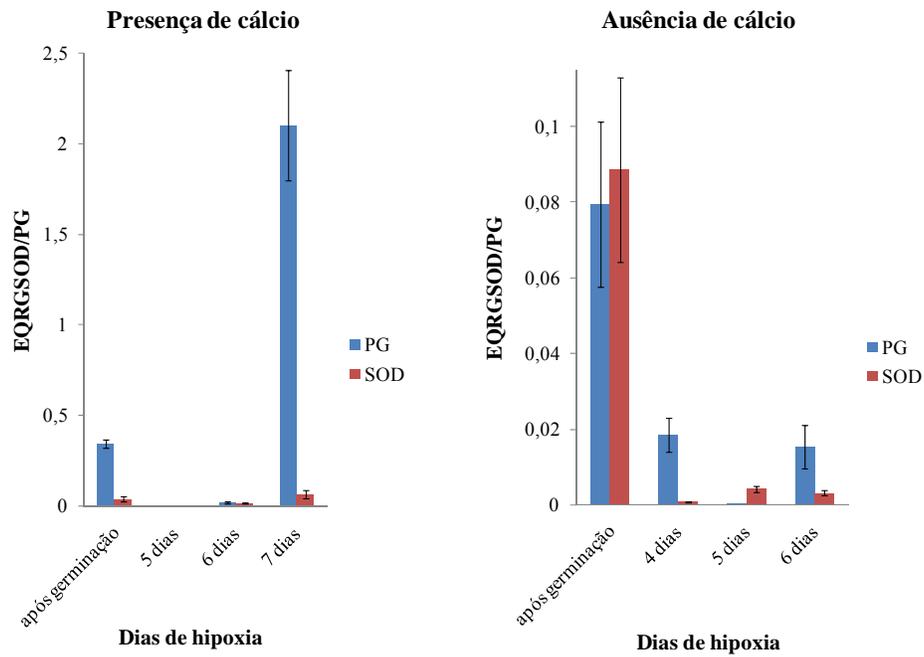


FIGURA 5 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes SOD e PG na região do mesocótilo, por PCR em tempo real (qRT-PCR) em diferentes períodos de estresse hipóxico na presença e ausência de cálcio.

5 CONCLUSÕES

O cálcio quando presente nos tampões de germinação e alagamento aumentou a tolerância do milho BRS 4154 (Saracura) ao estresse hipóxico. Esse aumento na tolerância foi devido ao fortalecimento da parede celular, fato esse que não ocorreu quando ele estava ausente. Nesse último caso, observou-se que as plântulas apresentaram com antecedência de um dia, uma região translúcida com uma forte constrição do mesocótilo. Esses eventos ocorreram na mesma região onde se verificou uma alta expressão dos genes PG e SOD, responsáveis pelos produtos gênicos poligalacturonase e superóxido dismutase respectivamente. Dados provenientes da microscopia fotônica e eletrônica de transmissão mostraram que a primeira enzima ao atuar sobre a parede celular, provoca um estreitamento da mesma, e que na ausência do cálcio, leva à formação de aerênquimas e a uma forte desestruturação da parede celular que provoca o aparecimento de contração no mesocótilo e com isso o tombamento e morte das plântulas. Na presença do cálcio, à exceção da desestruturação da parede celular, todos os eventos também ocorreram, porém com um dia de atraso. Este aumento na tolerância das plântulas à hipoxia pelo cálcio, se deve aos seus efeitos positivos na estruturação da parede celular. Já a superóxido dismutase, pode ter atuado sequestrando radicais livres e com isso evitando o colapso celular até o sexto e sétimo dias, quando da ausência e presença do cálcio, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS-PHILLIPS, L.; BARRY, C.; KANNAN, P.; LECLERCQ, J.; BOUZAYEN, M.; GIOVANNONI, J. Evidence that CTR1-mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose members display distinct regulatory features. **Plant Molecular Biology**, Netherland, v. 54, p. 387-404, 2004.

ALVES, E. **Apostila do curso de introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA, 2004. 43 p. Apostila.

ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; GOULART, P. F. P.; DANTAS, B. F.; GOUVÊA, J. A.; PURCINO, R. P.; MAGALHÃES, P. C.; FRIES, D. D.; LIVRAMENTO, D. E.; MEYER, L. E.; SEIFFERT, M.; SILVEIRA, T. Mecanismos de tolerância da variedade de milho “Saracura” (BRS 4154) ao encharcamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 1, p. 33-40, jan. 2002.

ANDRADE, A. C. S.; RAMOS, F. N.; SOUZA, A. F.; LOUREIRO, M. B.; BASTOS, R. Flooding effects in seedlings of *Cytharexylum myrianthum* Cham. and *Genipa americana* L.: responses of two neotropical lowland tree species. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 281-285, out. 1999. (Suplemento).

ANDREWS, D. L.; DREW, M. C.; JOHNSON, J. R.; COBB, B. G. The response of maize seedling of different ages to hypoxic and anoxic stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 1, p. 53-60, May 1994.

ARMSTRONG, W. Aeration in higher plant. **Advances in Botanical Research**, San Diego, v. 7, p. 225-332, 1979.

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

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

BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron Microscopy**. 2th ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1998. 670 p.

BURNS, J. K.; PRESSEY, R. Ca²⁺ in cell walls of ripening tomato and peach. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n. 5, p. 783-787, Sept. 1987.

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

CHANG, W. W. P.; HUANG, L.; SHEN, M.; WEBSTER, C.; BURLINGAME, A. L.; ROBERTS, J. K. M. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedling acclimated to a low-oxygen environment and identification of protein by mass spectrometry. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 2, p. 295-317, Feb. 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grão: quarto levantamento**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 18 jan. 2010.

CONWAY, W. S.; SAMS, C. E.; WATADA, A. E. Relationship between total and cell wall bound calcium in apples following postharvest pressure infiltration of calcium chloride. **Acta Horticulture**, The Hague, v. 398, p. 31-39, 1995.

CRANE, J. H.; DAVIES, F. S. Periodic and seasonal flooding effects on survival, growth, and stomatal conductance of young rabbiteye blueberry plant. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 4, p. 488-493, July 1998.

DAMARTY, 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.

DAMARTY, M.; MORVAN, C.; THELLIER, M. Calcium and cell wall. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 7, p. 441-448, 1984.

DESPRÉS, V. J.; BUCKLER, E. S.; SMITH, B. D.; GILBERT, M. T. P.; COOPER, A.; DOEBLEY, J.; PÄÄBO, S. Early allelic selection in maize as revealed by a ncient DNA. **Science**, New York, v. 302, n. 5648, p. 1206-1208, Nov. 2003.

DEUBER, R. **Ciências das plantas daninhas: fundamentos**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 432 p.

DING, J.; JIA, J.; YANG, L.; WEN, H.; ZHANG, C.; LIU, W.; ZHANG, D. Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 3372-3377, 2004.

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

DREW, M. C. 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.

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

FAJARDO, V.; GONZÁLEZ, I.; MARTÍN, I.; ROJAS, M.; HERNÁNDEZ, P. E.; GARCIA, T.; MARTÍN, R. Real time PCR for quantitative detection of Chamois (*Rupicapra rupicapra*) e Pyrenean Ibex (*Capra pyrenaica*) in meat mixtures. **Journal of the American Organization of Analytical Chemistry International**, Madrid, v. 91, n. 1, p. 103-111, 2008.

FERREIRA, J. L.; MAGALHÃES, P. C.; BORÉM, A. Avaliação de três características fisiológicas em 4 ciclos de seleção no cultivar de milho BRS-4154 sob solo encharcado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 2, n. 6, p. 1719-1723, nov./dez. 2008.

FERRER, D. D.; ALVES, J. D.; DELÚ FILHO, N.; MAGALHÃES, P. C.; GOULART, P. F. P.; MAGALHÃES, M. M. Crescimento de plântula do milho 'Saracura' e atividade de alfa-amilase e invertases associados ao aumento da tolerância ao alagamento pelo cálcio exógeno. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

FERRER, J. L. R.; CASTRO, E. M.; ALVES, J. D.; ALENCAR, M. A.; SILVA, S.; VIEIRA, C. V.; MAGALHÃES, P. C. Efeito do cálcio sobre as características anatômicas de raízes de milho (*Zea mays* L.) "Saracura" BRS-4154 submetido ao alagamento em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 172-181, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS . **Coarse grains production in 2009 to rise above last year's peak.** 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 18 jan. 2010.

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

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

GUGLIELMINETTI, L.; PERATA, P.; ALPI, A. Effect of anoxia on carbohydrate metabolism in Rice seedling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, n. 2, p. 735-741, June 1995.

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

HE, C. J.; DREW, M. C.; MORGAN, P. W. Induction of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea mays* L. during hipoxia or nitrogen starvation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 3, p. 861-865, July 1994.

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

HEPLER, P. K.; WAYNE, R. O. Calcium and plant development. **Annual reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 36, p. 397-439, 1985.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 19 jan. 2010.

JANG, J. Y.; KIM, D. G.; KIM, Y. O.; KIM, J. S.; KANG, H. S. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 54, p. 713-725, 2004.

KAWAI, M.; SAMARAJEEWA, R. A.; BARRERO, M.; NISHIGUCHI, H.; UCHIMIYA, H. Cellular dissection of degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation in rice roots. **Planta**, Berlin, n. 204, p. 277-287, 1998.

KAWASE, M. Anatomical and morphological adaptation of plants to waterlogging. **HortScience**, Alexandria, v. 16, p. 30-34, 1987.

KAWASE, M. Role of cellulase in aerenchymas developments in sunflower. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 66, p. 183-190, 1979.

KOLB, R. M.; MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; GILONI, P. C.; CORREA, G. T. Anatomia ecológica de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae) submetida ao alagamento. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 1-15, dez. 1998.

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

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

LAMMERS, P. J.; JUN, J.; ABUBAKER, J.; ARREOLA, R.; GOPALAN, A.; BAGO, B.; HERNANDEZ-SEBASTIA, C.; ALLEN, J. W.; DOUDS, D. D.; PFEFFER, P. E.; SHACHAR-HILL, Y. The glyoxylate cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus. Carbon flux and gene expression. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 1287-1298, 2001.

LIMA, L. C. O. **Tecido esponjoso em manga “Tommy atkins”: transformações químicas e bioquímicas no mesocarpo durante o amadurecimento**. 1997. 151 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MAGALHÃES, P. C.; SOUZA, T. C.; KARAM, D.; PARENTONI, S. N.; PEREIRA, F. J. Características de produção nos ciclos de seleção do milho Saracura BRS 4154 tolerante ao encharcamento do solo. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 27., 2008. Londrina. **Anais...** Londrina: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2008. 1 CD Rom.

MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1988. 560 p.

MC PHERSON, D. C. Cortical air spaces in the roots of *Zea mays* L. **New Phytologist**, Cambridge, v. 38, p. 190-202, 1939.

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

PANAVAS, T.; REID, P. D.; RUBISTEIN, B. Programmed cell death of dailily petals: activities of wall-based enzyme and effects of heat shock. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 3, n. 5, p. 379-388, 1998.

PARENTONI, S. N.; GAMA, E. E. G.; 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: REUNION LATINOAMERICANA, 4., REUNION DELA ZONA ANDINA DE INVESTIGADORES EM MAIZ, 17., 1997, Cerete y Cartagena de Ludias, Colômbia. **Memória...** Cerete y Cartagena de Ludias, Colômbia: CORPOICA/CIMMYT, 1997. p. 368-373.

PARENTONI, S. N.; GAMA, E. E. G.; MAGNAVACA, R; MAGALHÃES, P. C. Seleção para tolerância ao encharcamento em milho (*Zea mays* L.). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: o milho em perspectiva, 1995, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1995.

PASTORI, G. M.; FOYER, C. H. Common components networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 2, p. 460-468, June 2002.

PERATA, P.; GUGLIELMINETTI, L.; ALPI, A. Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. **Annals of Botany**, Oxford, v. 79, p. 49-56, Jan. 1997. Supplement.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1649-1656, dez. 2008.

PEZESHKI, S. R.; PARDUE, J. H.; DE LAUNE, R. D. Leaf gas exchange and growth of flood-tolerant and flood-sensitive three species under low soil redox conditions. **Tree Physiology**, Victoria, v. 16, n. 4, p. 453-458, Apr. 1996.

PINAZZA, L. A.; ALIMANDRO, R. Cenário atípico. **Agroanalysis**, São Paulo, v. 18, n. 8, p. 12-17, ago. 1998.

PURCINO, R. P. **Efeito fisiológico do cálcio na germinação e no crescimento inicial de plântulas de milho da variedade BRS-4154 "Saracura" e sua relação com o aumento da tolerância ao alagamento**. 2001. 40 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) -Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RANERE, A. J.; PIPERNO, D. R.; HOLST, I.; DICKAU, R.; IRIARTE, J. The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the Central Balsas River Valley, Mexico. **PNAS**, Washington, v. 106, n. 13, p. 5014-5018, Mar. 2009.

RICARD, B.; COUE, E. L.; RAYMOND, P.; SAGLIO, P. H.; SAINT-GES, V.; PRADET, A. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 32, n. 1, p. 1-10, Jan. 1994.

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; SYMONS, M. C. R. Techniques in free radical research. **Elsevier Science**, Amsterdam, v. 22, p. 291, 1991.

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

SAFTNER, R. A.; CONWAY, W. S. Effect of postharvest calcium chloride treatments on tissue water relations, cell wall calcium levels and postharvest life of "Golden delicious" apples. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 5, p. 893-897, Sept. 1998.

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

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, 1996.

SIDDIQUI, S.; BANGERTH, F. The effect of calcium infiltration on structural changes in cell walls of stored apples. **Journal of Horticultural Science**, Kent, v. 71, n. 5, p. 703-708, Sept. 1996.

SMALLWOOD, M. F.; CALVERT, C. M.; BOWLES, D. J. (Ed.). **Plant responses to environmental stress**. Oxford: BIOS Scientific, 1999. 224 p.

SOUZA, A. L. B. **Resistência pós-colheita do pêsego (*Prunus persica* (L.) Batsch cv. Biuti) a *Monilia fructicola*: indução de respostas bioquímicas pela aplicação de CaCl₂ no local da injúria**. 1998. 161 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SUBBAIAH, C. C.; BUSH, D. S.; SACHS, M. M. Elevation of cytosolic calcium precede anoxic genes expression in maize suspension cultured cell. **The Plant cell**, Rockville, v. 6, n. 12, p. 1747-1762, Dec. 1994.

SUBBAIAH, C. C.; ZHANG, J.; SACHS, M. M. Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 1, p. 369-376, May 1994.

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

VANTOAI, T. T. Extraction and determination of seed adenine nucleotides by different methods for anaerobic stress evaluation. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 17, n. 3, p. 439-451, 1989.

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

YAN, B.; DAI, Q.; LIU, X.; HUANG, S.; WANG, Z. Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 179, n. 2, p. 261-268, Feb. 1996.

YAN, C. X.; ZHANG, J.; CHAN, K. M.; LIU, X. K.; HONG, Y. Quantitative real-time PCR assay to detect transgene copy number in cotton (*Gossypium hirsutum*). **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 375, p. 150 -152, 2008.

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

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

ZANANDREA, I.; ALVES, J. D.; DEUNER, S.; SILVEIRA, N. M.; HENRIQUE, P. C. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Journal of Botany**, Collingwood, v. 57, p. 661-669, 2009.

ZENG, Y.; WU, Y.; AVIGNE, W. T.; KOCH, K. E. Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seeding survival. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, n. 2, p. 599-608, Oct. 1999.