



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA -
PRODUÇÃO VEGETAL E PROTEÇÃO DE PLANTAS**



Júlio César Farias de Andrade

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM GENÓTIPO DE
CANA-DE-AÇÚCAR TOLERANTE AO ESTRESSE HÍDRICO,
USANDO *real-time* RT-PCR**

RIO LARGO – AL, 2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA -
PRODUÇÃO VEGETAL E PROTEÇÃO DE PLANTAS**



Júlio César Farias de Andrade

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM GENÓTIPO DE
CANA-DE-AÇÚCAR TOLERANTE AO ESTRESSE HÍDRICO,
USANDO *real-time* RT-PCR**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Agronomia, na área de concentração de Produção Vegetal e Proteção de Plantas, pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, para obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Orientação:

Prof. Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida
Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade

RIO LARGO – AL, 2010

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Lucia Lima do Nascimento

A553a Andrade, Júlio César Farias de.
Análise de expressão gênica diferencial em genótipo de cana-de-açúcar tolerante ao estresse hídrico, usando *real-time* RT-PCR /Júlio César Farias de Andrade. – Rio Largo, 2010.
57 f.: il. tabs., graf.

Orientador: Cícero Carlos de Souza Almeida.
Co-orientador: Tiago Gomes de Andrade.
Dissertação (mestrado em Agronomia: Produção vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2010.

Bibliografia: f. 52-57.

1. Cana-de-açúcar. 2. Cana-de-açúcar - Estresse hídrico. 3. Cana-de-açúcar- Expressão gênica. 4. *Real time* RT-PCR. I. Título.

CDU: 633.61

TERMO DE APROVAÇÃO

ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM GENÓTIPO DE CANA-DE-AÇÚCAR TOLERANTE AO ESTRESSE HÍDRICO, USANDO *real-time* RT-PCR

JÚLIO CÉSAR FARIAS DE ANDRADE
(Matrícula 0810M07)

A dissertação acima especificada foi submetida ao Curso de Mestrado em Agronomia, na área de concentração de Produção Vegetal e Proteção de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial na integralização dos créditos para obtenção do grau de mestre em ciências, tendo sido aprovada pela Banca Examinadora formada pelos seguintes doutores:


Prof. Dr. Cicero Carlos de Souza Almeida - Orientador
Laboratório de Recursos Genéticos (UFAL – Campus Arapiraca)
Orientador


Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade - Titular
Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica (UFAL – Campus Arapiraca)


Prof. Dr. José Vieira Silva - Titular
Laboratório de Fisiologia Vegetal (UFAL – Campus Arapiraca)


Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano - Titular
Laboratório de Biotecnologia de Plantas e Produtos Naturais (IQB - UFAL)

Rio Largo, Estado de Alagoas, Brasil
30 de agosto de 2010.

*“Deixai que os fatos sejam
fatos naturalmente, sem que sejam
forjados para acontecer...”*

(Chico Science)

Ofereço

A Deus

Por me manter fiel aos objetivos que tracei para a minha vida, pelo amor dos meus familiares, pela benção de ter amigos e especialmente pelo meu filho.

DEDICO

*À minha querida mãe, Maria da Assunção (**in memorian**),
por ter deixado um exemplo inquestionável de ternura e
dedicação à família.*

*Ao meu pai, Jurandir,
pelos diálogos que auxiliaram a formação da minha
personalidade e por ser um dos principais motivos para o
meu empenho diante dos desafios acadêmicos.*

*À minha companheira de tantos anos, Claudizete,
por acreditar sempre que vale a pena estar ao meu lado e
por ser uma mãe amorosa para o meu querido filho, o
mais belo presente que já recebi.*

*A ele, César Augusto,
por alegrar a minha vida e me ensinar diariamente os
diversos significados da palavra “papai”.*

*À minha tia, Rose,
pelo carinho e acolhimento maternal de sempre.*

*Aos manos, Marcos, Grace e Alexandre,
por todos os momentos felizes que compartilhamos e
compartilharemos.*

*Aos demais familiares e amigos,
pelas contribuições que de alguma forma possibilitaram a
concretização desse trabalho.*

Agradecimentos

À Universidade Federal de Alagoas, por incentivar e colocar em prática a Política de Desenvolvimento de Pessoal, instituída pelo Decreto 5.707 de 23 de fevereiro de 2006.

Ao programa de pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Alagoas, por ter acolhido um farmacêutico em seu Curso de Mestrado, mostrando a disposição em contribuir para a multidisciplinaridade dentro do ambiente acadêmico.

Ao Prof. Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida, pela orientação, amizade, ensinamentos e apoio durante o período de mestrado.

Ao Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade, por ter disponibilizado o Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica no Campus UFAL - Arapiraca para a execução de um trabalho diferenciado, pela amizade e ensinamentos.

Aos professores Me. Valdevan Rosendo, Dr. Márcio Lins e Me. Cícero Adriano e ao graduando André Lins, pelo companheirismo, pelo acolhimento e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Luis Antônio Ferreira da Silva, por ter disponibilizado o Laboratório de DNA Forense e Diagnóstico Molecular para a execução da análise de real-time RT-PCR e ao Me. Benísio Ferreira, pela amizade e intervenção técnica no momento exato.

Ao Prof. Dr. Josealdo Tonholo, por ser um incentivador constante da minha ascensão acadêmica e profissional e do meu empreendedorismo pessoal.

Ao Prof. Dr. Edson Bento, por apoiar e autorizar, mesmo sob pressão contrária, os pedidos de afastamento das minhas funções profissionais para a execução da parte prática do curso de mestrado, realizada no Campus Arapiraca – UFAL.

À Profa. Dra. Buendía, pelas correções linguísticas feitas durante a construção do texto final da dissertação, pela dedicação, amizade, apoio e palavras encorajadoras.

Ao corpo docente do Curso de Mestrado em Agronomia da UFAL, especialmente à Profa. Dra. Leila Rezende, pela paciência em escutar tantas lamúrias.

Aos membros da banca, Dr. Tiago Gomes, Dr. José Vieira e Dr. Luiz Carlos Caetano, pelas correções e sugestões pertinentes.

Aos amigos dos laboratórios do Instituto de Química e Biotecnologia – UFAL, Sandra Quintela, Wirla Gonçalves, Cida Alves e Fábio Silva, pela compreensão e ajuda durante os afastamentos das minhas funções.

Aos amigos do laboratório BIOVEG, Paulo Pedro da Silva, Velber Nascimento e Luis Sérgio Costa, pela boa recepção no início dos trabalhos e apoio constante.

Aos amigos dos laboratórios do campus Arapiraca, Diego, Beth, Daniel, Júnior, Thalita, Ednaldo, Alberto, Josione, Marislane, Sandra, Milton, Dennis, Suzanne e Aline.

Aos secretários do Curso de Mestrado em Agronomia, Geraldo de Lima e Marcos Lopes, pela competência, amizade e presteza no atendimento aos alunos de pós-graduação.

Aos colegas de curso, pelo companheirismo durante os intermináveis momentos de dedicação aos estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Classificação botânica e origem da cana-de-açúcar	14
2.2 Cultivo	15
2.3 Importância econômica e social	16
2.4 Variedades comerciais de cana-de-açúcar usadas no Brasil	18
2.5 Mudanças morfofisiológicas vegetais causadas por déficit hídrico	20
2.6 Mudanças morfofisiológicas em cana-de-açúcar causadas por déficit hídrico	22
2.7 Estresse por déficit hídrico e expressão gênica em cana-de-açúcar	24
2.8 Análise de expressão gênica diferencial – <i>real-time</i> RT-PCR	26
3. CAPÍTULO 1 - ARTIGO CIENTÍFICO	30
4. CONCLUSÕES	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Resultados médios das análises de fisiologia para o tratamento controle (CC) e estresse hídrico (SS). E (transpiração foliar), A (fotossíntese líquida), g_s (condutância estomática) e F_v/F_m (eficiência fotossintética). **35**
- Figura 2 -** Expressão diferencial de 11 genes no genótipo RB72910 sob estresse hídrico severo. Padrão de expressão baseado no gene de referência da β -tubulina. **36**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Espécies do complexo <i>Saccharum</i> , conteúdo de açúcar e número de cromossomos	14
Tabela 2 -	C_t de expressão diferencial dos genes usados na <i>real-time</i> RT-PCR, acesso RB72910	34

RESUMO

No Brasil ainda não há uma variedade de cana-de-açúcar transgênica comercial usada em larga escala, porém pesquisas biotecnológicas na área de expressão gênica estão sendo feitas visando a obtenção de variedades que possam ser cultivadas em condições de baixa pluviosidade, altas temperaturas e solos com pouca fertilidade. No presente trabalho foi analisada a expressão gênica diferencial em folhas na variedade de cana-de-açúcar RB72910 nas condições de capacidade de campo e sob estresse hídrico severo em casa de vegetação. A avaliação foi feita por meio da técnica *real-time* RT-PCR, uma potente ferramenta usada para identificar e quantificar mudanças significativas nos níveis de transcritos, facilitando a seleção de genes candidatos à utilização em transgenia. Para isso foi analisada a expressão de 11 genes em amostras foliares em duas condições de regime hídrico. Os genes analisados foram: *DNAJ*, *PGR5*, *H1*, *PSI*, *LTP*, *WIP*, *ZmPIP2-1*, *ZmTIP4-2*, *SAMDC* e dois genes com funções indeterminadas. Observou-se que a variedade estudada demonstrou expressão diferencial sob estresse hídrico principalmente para genes que codificam proteínas de proteção do sistema fotossintético e de manutenção da homeostase. Com isso, concluímos que o genótipo RB72910 apresenta importantes características agronômicas de fotoproteção e de adaptação à seca.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, Estresse Hídrico, Expressão Gênica, *real-time* RT-PCR.

ABSTRACT

In Brazil there is still no variety of commercial transgenic sugarcane used in large scale, although biotechnological research in the area of gene expression has been performed in order to obtain varieties that can be cultivated in low rainfall, high temperatures and in low fertil soils. In the present work it was analysed the diferencial gene expression in leaves of the variety of sugarcane RB72910 in field capacity and under severe water stress in a greenhouse. The evaluation was done using the technique *real-time* RT-PCR a powerful tool used to identify and quantify significant changes in the levels of transcripts, facilitating the selection of candidate genes for use in transgenic plants. For this we analyzed the expression of 11 genes in leaf samples in two conditions of water regime. The genes analyzed were: *DNAJ*, *PGR5*, *H1*, *PSI*, *LTP*, *WIP*, *ZmPIP2-1*, *ZmTIP4-2*, *SAMDC* and two genes with unknown functions. It was observed that the variety studied showed diferencial gene expression under water stress mainly for genes encoding proteins of the protective fotosynthetic system and for maintenance of the homeostasis. Thus, it was concluded that the genotype RB72910 has important agronomical traits of fotoprotection and adaptation to drought.

Key-words: Sugarcane, water stress, gene expression, *real-time* RT-PCR.

1. Introdução

A importância da cultura canieira para a economia mundial é indiscutível, pois seu produto serve como matéria-prima para a produção do açúcar usado na dieta humana, álcool e biomassa, sendo essa última usada como alimento animal, além de muitos outros subprodutos que também possuem valor comercial, com um aproveitamento próximo ao limite máximo do potencial produtivo da planta (FELIX, 2006; BRANCO, 2008). Avaliando-se apenas o consumo de açúcar no mundo, verifica-se que esse é superior a 170 milhões de toneladas e apresenta um acréscimo de 3,8% ao ano, mostrando o motivo pelo qual a cana-de-açúcar é considerada uma das dez culturas mais importantes do planeta (AIDAR, 2010).

O déficit hídrico causa grandes perdas na produção da cana-de-açúcar, sendo um dos mais importantes efeitos abióticos negativos para essa cultura em países onde a disponibilidade hídrica não é abundante. Em ambientes que apresentam essa característica, conhecer as respostas de certas variedades às adversidades climáticas pode ajudar aos programas que trabalham no melhoramento genético da cultura a escolher cultivares de interesse (INMAN-BAMBER & SMITH, 2005).

Para que haja resposta molecular a uma modificação ambiental, como o déficit hídrico, é necessário que a planta consiga perceber esta modificação por meio de receptores específicos, que podem iniciar ou suprimir um conjunto de respostas no vegetal (RIERA, 2005). Essas respostas moleculares, em cana-de-açúcar, estão relacionadas à regulação de genes por meio de um processo de sinalização celular que gera ao final, proteínas que protegem a planta contra os efeitos deletérios do déficit hídrico (RODRIGUES et al., 2009).

Atualmente uma das ferramentas mais usadas para a determinação da expressão gênica em amostras submetidas a algum tipo de estresse biótico ou abiótico, inclusive em tecidos vegetais provenientes de cana-de-açúcar, é a reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real-time* PCR). É uma técnica quantitativa capaz de analisar a expressão de um gene específico a cada ciclo, usando um gene de referência como um padrão interno, o *housekeeping*, o qual não deve ser regulado ou influenciado pelo procedimento experimental, e substâncias fluoróforas que são detectadas a cada duplicação do DNA molde, que pode ser proveniente de uma extração direta desse ácido nucléico ou de uma extração de mRNA, que é, posteriormente, convertido

enzimaticamente em cDNA. Quando existe essa etapa analítica intermediária de obtenção de cDNA, a técnica recebe o nome de *real-time* RT-PCR (PFAFFL, 2001; RADONIC et al., 2004).

Tendo como base os assuntos supracitados, o objetivo geral desse trabalho é analisar a expressão gênica diferencial na variedade de cana-de-açúcar RB72910 submetida a déficit hídrico controlado em casa de vegetação, usando a técnica de *real-time* RT-PCR, por meio dos seguintes objetivos específicos:

1. Obter tecido vegetal foliar da variedade RB72910 representativo para análise de expressão gênica diferencial ocasionada por estresse hídrico;
2. Analisar comparativamente os aspectos fisiológicos da variedade RB72910 quando submetida a déficit hídrico e à capacidade de campo;
3. Analisar a expressão diferencial de 11 genes específicos nos tecidos foliares de amostras da variedade estudada submetidas a estresse hídrico e em condições de capacidade de campo.

Partindo desses objetivos, a presente dissertação foi estruturada em um único capítulo, na forma de artigo científico, especificado como:

- Análise de expressão gênica diferencial em genótipo de cana-de-açúcar tolerante ao estresse hídrico, usando *real-time* RT-PCR.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Classificação botânica e origem da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum* L., da tribo Andropogoneae, família Poaceae, que inclui gramíneas como cereais do gênero *Sorghum* e *Zea*. O chamado complexo *Saccharum* é composto por cinco gêneros com características em comum, como altos níveis de poliploidia e números de cromossomos “desbalanceados”, que dificultam a determinação da taxonomia e requerem revisões taxonômicas recorrentes. Os gêneros são *Saccharum*, *Erianthus* sect. *Ripidium*, *Miscanthus* sect. *Diandra*, *Narenga* e *Sclerostachya*. O gênero *Saccharum* L. compreende seis espécies: *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. edule*, *S. barberi* e *S. sinense*, que apresentam diferentes números de cromossomos, como mostrado na tabela 1 (BACCI Jr et al., 2001; Australian Government, 2004).

Tabela 1 - Espécies do complexo *Saccharum*, conteúdo de açúcar e número de cromossomos

Espécies	Cruzamentos de origem	Conteúdo de Açúcar	Número de cromossomos
<i>S. spontaneum</i>	Selvagem	-----	2n = 40-128
<i>S. robustum</i>	Selvagem	-----	2n = 60-200
<i>S. officinarum</i>	<i>S. spontaneum</i> / <i>Mischantus sinenses</i> / <i>Erianthus arundinaceus</i>	Alto	2n = 80
<i>S. barberi</i>	Híbrido ancestral	Baixo	2n = 111-120
<i>S. sinense</i>	Híbrido ancestral	Baixo	2n = 80-124
<i>S. edule</i>	Selvagem	-----	2n = 60-80

Fonte: Australian Government (2004).

A origem genética da cana-de-açúcar pode ser desmembrada em três grupos, segundo Grivet (2004): cultivares tradicionais, espécies selvagens e cultivares modernos. Os cultivares tradicionais, ainda segundo o autor, descendem diretamente dos primeiros cruzamentos entre espécies domesticadas e podem ser divididos em dois grupos, os cultivares nobres ricos em açúcar oriundos da Melanésia - Oceania, e os cultivares do Norte da Índia e China, com conteúdo de açúcar menor que os cultivares

nobres. No grupo das espécies selvagens estão a *S. edule*, *S. spontaneum* L., oriunda da Melanésia, Ásia Tropical e parte da África; *S. robustum* Brandes e Jeswiet ex Grassl, da Nova Guiné e ilhas da Melanésia; além de espécies dos gêneros *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* e *Sclerostachya*, com ampla distribuição territorial, como Himalaia, Sibéria e Ilhas do Pacífico, mas com maior concentração no Nordeste da Índia sub-continental. O último grupo, dos cultivares modernos, vem sendo desenvolvido desde o último século, por meio de muitas gerações de cruzamentos artificiais entre espécies já domesticadas com características de interesse agrônomo, como *S. officinarum* e *S. spontaneum* (YANG et al., 2003; ROSSI et al., 2003).

2.2 Cultivo

Existem divergências quanto ao início do cultivo da cana-de-açúcar no mundo, mas indícios mostram que povos antigos, que viveram entre 12.000 e 6.000 anos antes de Cristo, deram início à sua domesticação, principalmente em Papua Nova Guiné. Em aproximadamente 4.000 anos o cultivo se estendeu dessa região à Península Malaia, Indochina e Baía de Bengala. Mesmo com o conhecimento relacionado ao plantio já difundido entre os povos há milênios, o fabrico de açúcar só ocorreu em 400 a.C., na China, sendo que em 700 d.C se iniciou o verdadeiro comércio e a expansão mediterrânea da cultura, chegando até a Sicília, na Itália, de onde foi levada à Ilha da Madeira, situada no Oceano Atlântico (BONILHA, 2007).

Foram os portugueses, que dominam o seu cultivo desde 1420, os introdutores da cana-de-açúcar na Ilha da Madeira, por ordem do Infante Dom Henrique e por meio de mudas de plantas vindas da Sicília. Já no Brasil, o cultivo tem como ponto inicial o primeiro alvará, escrito em 1516 por Dom Manuel. No entanto a cana-de-açúcar só foi trazida realmente em 1532 por Martim Afonso de Sousa, que iniciou o seu plantio na Capitania de São Vicente, onde construiu o primeiro engenho, chamado de “Governador” e posteriormente de “São Jorge dos Erasmos”. Essa cultura ganhou uma dimensão tão grande que o Brasil registra um período específico na sua história, o chamado Ciclo da Cana-de-Açúcar (MAPA, 2008).

O principal pólo de produção, após a introdução da cultura da cana-de-açúcar, foi a região litorânea do Nordeste brasileiro, que perdeu espaço, com o passar dos anos, para a região Sudeste, principalmente para o Estado de São Paulo, que hoje é responsável por cerca de 60% da produção nacional. A intensa propagação do cultivo da

cana-de-açúcar no país provém do fato de que ela pode ser utilizada sob a forma de forragem, como alimento animal ou ainda como base para o fabrico de muitos produtos, como açúcar, álcool, rapadura, melado e aguardente, sendo, por isso, uma das mais importantes espécies cultivadas (OLIVEIRA, 2006; MAPA, 2007).

Estima-se que, no presente, são cultivados cerca de 20 milhões de hectares de cana-de-açúcar nas regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo, com uma moagem atingindo aproximadamente 1,3 bilhões de toneladas dessa matéria-prima, voltada em sua maioria para a produção de açúcar. Contudo, a atenção dos produtores tem se voltado para a produção de álcool, fazendo da cana-de-açúcar uma importante fonte de biocombustível renovável alternativo ao petróleo (KOJIMA & JOHNSON, 2006; MENOSSI, 2007).

Atualmente a cana-de-açúcar vem ganhando espaço também como plataforma de produção ou biofábrica, onde moléculas com alto valor agregado ou novas rotas metabólicas são produzidas em seu interior por intermédio de manipulação genética, abrindo novas perspectivas de mercado e adicionando ainda mais valor a esta *commodity* agrícola (MA et al., 2003; McQUALTER et al., 2005; NELL, 2007).

2.3 Importância econômica e social

Desde o período colonial no Brasil, a cana-de-açúcar é considerada um dos principais produtos agrícolas do país (PESSOA-JR, 2005; MARIN et al., 2008). A indústria sucroalcooleira atual movimentava aproximadamente R\$ 40 bilhões por ano, paga 12 bilhões de reais em impostos anualmente e tem uma importância social tão grande quanto estes montantes, gerando cerca de 4 milhões de empregos diretos e indiretos e incorporando mais de 72 mil agricultores (ANSELMINI, 2006).

O uso do álcool derivado da cana-de-açúcar como biocombustível tem feito vários países como USA, China, Índia, Colômbia e México estudarem a incorporação desse produto em suas matrizes energéticas, ocasionando uma grande demanda por parte destes países e um aumento na exportação do álcool combustível brasileiro. As perspectivas apontam para uma demanda mundial de cerca de 10 bilhões de litros de álcool até 2011. Essa demanda mundial por biocombustíveis é o motivo principal para a grande expansão do cultivo da cana-de-açúcar no Brasil. Essa expansão não é exclusividade do Brasil, tem acontecido em outros países sul-americanos, asiáticos e africanos, e para que a indústria sucroalcooleira brasileira se consolide como líder

precisa se concentrar em pontos imprescindíveis como planejamento da produção, políticas públicas de regulação do abastecimento interno e das exportações, entre outros (OLIVEIRA, 2006; TORQUATO, 2006).

Quanto à produção brasileira, o primeiro levantamento sobre a safra de cana-de-açúcar 2010/11, realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), aponta para um aumento de 10% com relação à safra passada, aproximadamente 59,8 milhões de toneladas a mais, chegando a um montante total de cerca de 664 milhões de toneladas. Nesta safra, 45,4% da cana esmagada foram direcionados para a produção de açúcar e os 54,6% restantes para a produção de álcool, gerando 28,5 milhões de litros, com preferência para a produção do álcool hidratado (20,1 milhões de litros). A crescente frota nacional de veículos *flex-fuel*, com aproximadamente 10 milhões de unidades na atualidade, justifica esse direcionamento da produção de cana-de-açúcar, apesar do crescente interesse mundial por um combustível limpo e renovável. Ainda segundo o mesmo levantamento, o sincronismo entre a alta tecnologia aplicada no cultivo e as boas condições climáticas deixam a cana-de-açúcar num excelente nível agrônomo, quando comparada a outras culturas (CONAB, 2010).

O reflexo de investimentos nos avanços tecnológicos também se faz notar na produtividade da cana-de-açúcar brasileira. Hoje o país possui as melhores técnicas para o plantio e colheita deste produto. A produtividade por hectare, em 1975, era de 47 toneladas; atualmente, com o uso de novas variedades, essa produtividade é de 78 toneladas por hectare. A qualidade da tecnologia nacional também influencia positivamente a extração dos produtos derivados da cana-de-açúcar: enquanto se extraía 45 litros de etanol por tonelada, em 1975, extrai-se 80 litros de etanol de cada tonelada de cana limpa, sem palha, nos dias de hoje. Por hectare se produz mais de 7,5 mil litros de etanol, dado atual, enquanto que em 1975 girava em torno de 3 mil litros de etanol/hectare. Vale a pena salientar que todos os equipamentos que proporcionaram estes aumentos de produtividade foram desenvolvidos e produzidos no Brasil (MAPA, 2009).

Apesar dos números indicarem um aumento de qualidade significativo no tocante à produção, produtividade e das técnicas e equipamentos usados na indústria sucroalcooleira brasileira, os efeitos abióticos podem gerar grandes prejuízos. Em países onde a cana-de-açúcar é produzida, principalmente nos tropicais e em menor extensão nos sub-tropicais, a água é um fator limitante para a produção (INMAN-BAMBER, 2004; INMAN-BAMBER & SMITH, 2005).

Estresse pode ser entendido como qualquer situação que deixe o organismo em situação de desvantagem (NOGUEIRA, 2004) e estresse hídrico, por sua vez, é definido como qualquer potencial hídrico abaixo de zero; considerando que o potencial hídrico da água pura sob pressão atmosférica normal é igual a zero, qualquer perda de água em um solo saturado ocasiona um estresse hídrico (HUSSAIN et al., 2004). Em locais onde a irrigação não está disponível, o conhecimento das relações hídricas são importantes auxiliares nos programas de melhoramento vegetal, e a resistência à seca pode ser um importante aspecto para a seleção de novos cultivares (INMAN-BAMBER & SMITH, 2005; EMBRAPA AGROENERGIA, 2009). Apesar do grande genoma da cana-de-açúcar ser considerado um desafio singular para as abordagens genéticas (MA et al., 2003), os estudos têm apontado importantes características fenotípicas agrônomicas interessantes para a indústria sucroalcooleira, como a própria resistência à seca (CARSON & BOTHA, 2000; PAPINI-TERZI et al., 2009).

A indústria sucroalcooleira brasileira está passando por um novo período de ampliação, com investimentos no desenvolvimento tecnológico por meio de esforços conjuntos do setor privado e órgãos governamentais. Um exemplo disso é a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA), que estabelece uma conexão entre diversas Universidades Federais no tocante à pesquisa relacionada à cana-de-açúcar (MAPA, 2007). Esses investimentos estão favorecendo a expansão da área de plantio, que já extrapolou as tradicionais regiões do Nordeste brasileiro e avança pelos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, além de novas regiões em Estados como São Paulo, por exemplo (TORQUATO, 2006).

2.4 Variedades comerciais de cana-de-açúcar usadas no Brasil

Um dos maiores incrementos no melhoramento da história da cana-de-açúcar em busca de melhores variedades comerciais foi a obtenção do primeiro híbrido pelo *Sugarcane Breeding Institute* (Coimbatore, Índia), o Co205, que aconteceu em 1912 pelo cruzamento da *S. officinarum* com a *S. spontaneum*. O Co205 se mostrou adaptável ao clima e às condições do solo nas regiões subtropicais e a produtividade desse híbrido apresentou um aumento de 50% quando comparada com a de espécies nativas. Outros cultivares, clones propagados por meio de fragmentos de caules, foram desenvolvidos por meio de retrocruzamentos, num processo de investigação de variedades mais produtivas com relação à quantidade de açúcar e mais resistentes aos estresses. Esse

processo é denominado nobilitação e até hoje os melhoristas vegetais acreditam nos cruzamentos de cultivares atuais considerados de elite (JANNOO et al., 1999; GRIVET, 2003; SELVI et al., 2005).

Diante da perspectiva mundial pelo aumento da produção de alimentos e de combustíveis alternativos ao petróleo, como o álcool, torna-se evidente a necessidade de produzir novas variedades de cana-de-açúcar que atendam a esta demanda crescente. Para alcançar esse objetivo, o Brasil terá que lançar mão de estudos clássicos de melhoramento genético associados a ferramentas biotecnológicas como micropropagação e transformação genética. Essas técnicas possibilitam a obtenção de variedades transgênicas produzidas a partir de outras já existentes, buscando plantas com características de interesse agrônomo, como resistência à herbicidas, pragas e doenças, e de interesse industrial, como maior teor de sacarose ou de fibras (CARRER, 2008).

Mesmo já possuindo a visão da necessidade do desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar que acompanhem os desafios impostos pelos estresses bióticos e abióticos da realidade brasileira, os estudos em cana-de-açúcar realizados na Embrapa ainda são recentes. Foram iniciados em 2006 com o Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011, que contempla a cultura sucroalcooleira e as pesquisas; desde então, são direcionadas para as áreas de avaliação de variedades, fixação biológica de nitrogênio, biotecnologia, sistemas de produção e entomologia, entre outras; essas pesquisas são realizadas com o apoio de redes multi-institucionais e reúnem tanto parceiros públicos quanto privados no desenvolvimento de projetos que buscam a resolução de problemas tecnológicos de importância nacional (PAIVA, 2010).

Outro centro de pesquisas brasileiro voltado para a obtenção de variedades de cana-de-açúcar com alto valor comercial é o Centro de Tecnologia Canavieira, responsável pelas variedades CTC. É possuidor de um dos maiores bancos de germoplasma do mundo voltado para a cultura e realiza pesquisas em várias outras áreas, tais como plantio e colheita mecanizada, controle biológico de pragas, geoprocessamento, imagens de satélites, etc. A importância desse centro de pesquisas é reconhecida no mundo inteiro, tanto que a BASF, empresa alemã com alcance mundial, firmou uma parceria de cooperação em biotecnologia tendo como meta colocar no mercado, em dez anos, variedades 25% mais produtivas e mais resistentes a estresses abióticos que as atuais (CENTEV-UFV, 2009).

Atualmente as variedades mais comercializadas no Brasil são a RB72454 (RIDESA), presente em cerca de 15% dos canaviais, a SP89-1115, encontrada em 5% da área plantada e a RB867515 (RIDESA), cultivada em cerca de 15% da área reservada para o plantio em São Paulo. No entanto, a quantidade de variedades cultivadas no Brasil é muito grande; para exemplificar, só no Estado de São Paulo estima-se que são cultivadas mais de 80 variedades de cana-de-açúcar. O plantel existente no país é tão diversificado que algumas variedades estão sendo diretamente testadas para evitar a entrada de doenças fúngicas no país. É o caso de 80 variedades que foram recentemente enviadas à Costa Rica para testes de resistência à ferrugem laranja, patologia causada pelo fungo *Puccinia kuehnii*, que só na Austrália causou uma perda em torno de 67% a 87% na produção e vem se alastrando nas Américas do Norte e Central, com prejuízos em torno de 20% da produção nos países afetados. Tal medida visa a identificação de variedades resistentes que possam substituir as cultivadas atualmente, caso a doença avance e adentre no Brasil (PAIVA, 2010).

2.5 Mudanças morfofisiológicas vegetais ocasionadas por déficit hídrico

O termo déficit hídrico tem muitos significados dentro dos meios científicos e tecnológicos, que variam de acordo com a área de atuação do pesquisador e, logicamente, do seu interesse pelo assunto. Um exemplo disso é que geologistas e paleontologistas estudam os períodos de baixa disponibilidade de água em milênios, focando as mudanças climáticas em termos majoritários. Do outro lado da escala, bioquímicos e biólogos moleculares se preocupam com os efeitos deletérios desse estresse abiótico causados pela redução hídrica em horas, ou seja, pela rápida dessecação do ambiente estudado, observando respostas a choques severos e sobrevivência do material pesquisado (PASSIOURA, 2006).

As plantas estão susceptíveis às modificações ambientais tais como as de temperatura, de ataque de herbívoros, doenças, déficits nutricionais e/ou hídricos, exigindo delas uma adaptação rápida e eficiente que permita a sobrevivência nesta oscilação de condições adversas. Nesse sentido, observa-se que as plantas superiores possuem uma grande plasticidade adaptativa e reagem aos diferentes tipos de estresse com respostas específicas no crescimento, desenvolvimento e metabolismo. A irreversibilidade das alterações causadas pelo estresse hídrico nas plantas, por exemplo, depende do genótipo, da duração da deficiência hídrica, da severidade e do estágio de

desenvolvimento, além da quantidade de água disponível no solo. O valor do entendimento dessas respostas específicas é alto, principalmente para as pesquisas agrícolas voltadas para a obtenção de variedades de culturas vegetais tolerantes aos estresses bióticos e abióticos (SANTOS & CARLESSO, 1998; NOGUEIRA et al., 2003; BARGMANN & MUNNIK, 2006).

Estima-se que as plantas utilizem cerca de 65% da água “fresca” mundial e, diferentemente de outras *commodities*, a água não pode ser substituída na agricultura, além de ser inviável o transporte de grandes quantidades dessa substância por mais que algumas centenas de quilômetros. Visto de outra maneira, um déficit hídrico por um longo período pode ser responsável também por mudanças sociais profundas. Migrações em massa, redução de rebanhos animais, ameaça à saúde humana, aumento do potencial de conflitos internacionais (RIERA et al., 2004), acréscimo da quantidade de famintos e desertificação são consequências diretas de períodos prolongados de seca. Sendo assim, o aprofundamento das pesquisas e, principalmente, a articulação das conexões entre os estudiosos do tema e agricultores visando o melhor desempenho das plantas cultivadas e, conseqüentemente, o benefício da população humana, são alguns dos grandes desafios para a ciência agrícola, pois isto requer uma linguagem em comum, onde os termos usados sejam os mesmos, bem como o significado desses termos (PASSIOURA, 2006).

Dependendo da intensidade ou da duração do estresse hídrico, as modificações fisiológicas podem ser distintas. Uma rápida ou lenta perda da água disponível no solo acarretará resultados diferentes em termos de respostas fisiológicas ou adaptações nos vegetais. Sob um estresse hídrico lento, as plantas podem responder com uma diminuição do ciclo de vida ou otimizar suas relações hídricas para melhor se adaptar às modificações ambientais. Se o estresse hídrico for abrupto, as plantas tendem a responder com a minimização da perda de água ou com algum tipo de proteção metabólica contra os efeitos desidratantes e oxidativos. Essas respostas podem variar muito de acordo com o genótipo das plantas e o ambiente onde elas se encontram (CHAVES et al., 2003).

A diminuição da área foliar, o fechamento dos estômatos, a aceleração da senescência e a abscisão foliar são as respostas mais relevantes ao estresse hídrico. Outras modificações importantes nos processos fisiológicos são a redução no desenvolvimento das células, da transpiração, da condutância estomática, da atividade fotossintética e da translocação de assimilados e um aumento de espécies reativas de

oxigênio (ROS, sigla em inglês). A morfologia radicular também sofre modificações em plantas submetidas a um estresse hídrico, emitindo pelos radiculares que aumentam a área superficial e a absorvidade radiculares, proporcionando um melhor aproveitamento da água disponível no solo (CHRISTMANN et al., 2007; CARVALHO, 2008; GHANNOUM, 2009).

Observando tais respostas dos vegetais ao déficit hídrico, técnicas moleculares têm sido utilizadas na identificação de genes envolvidos nas respostas das plantas a esse tipo de estresse. Estas técnicas possibilitam a manipulação de características de interesse à agricultura e visam a obtenção de plantas resistentes aos patógenos e às adversidades naturais (BRASILEIRO et al., 2008; RODRIGUES, 2009) Uma das culturas que pode ser beneficiada com essas técnicas é a da cana-de-açúcar, já reconhecidamente tão desenvolvida no Brasil.

2.6 Mudanças morfofisiológicas em cana-de-açúcar ocasionadas por déficit hídrico

O entendimento dos processos fisiológicos da cana-de-açúcar e as interações desses com outros processos ligados a esta cultura é a base para a maioria das decisões tomadas pela indústria sucroalcooleira mundial, desde a seleção de genótipos, passando pela estratégia de gerenciamento da cultura e investimentos em infraestrutura, chegando até às decisões de marketing da indústria. Por isso, grande quantidade de pesquisas fisiológicas de campo com condições ambientais controladas vêm sendo realizadas e estão contribuindo para o entendimento específico da cultura da cana-de-açúcar e os dados obtidos têm sido usados para a criação de modelos experimentais que proporcionarão um acréscimo considerável na compreensão dos mecanismos fisiológicos dessa cultura (LISSON et al., 2005).

O estresse por déficit hídrico altera muitos processos e condições fisiológicas, como os de absorção de radiação, temperatura foliar, condutância estomática, transpiração, transporte de elétrons, fotossíntese, respiração, concentração intracelular de solutos, os quais estão ligados ao rendimento final nos vegetais. A habilidade de manter estes processos mesmo em condições de estresse hídrico moderado é um indicativo de que a planta terá uma produção sustentada mesmo sob uma redução na disponibilidade hídrica ambiental (SCHULZE et al., 2005; SILVA et al., 2007).

A condição ideal para a produção da cana-de-açúcar é caracterizada por apresentar duas estações bem definidas, uma delas quente e úmida, que favorece a germinação, perfilhamento e o desenvolvimento vegetativo e outra fria e seca, que é ideal para promover a maturação e o acúmulo de sacarose (MAPA, 2007). Os estágios de perfilhamento e desenvolvimento vegetativos são os mais críticos no tocante à disponibilidade de água, principalmente porque é nessas fases que 70-80% do rendimento da cana-de-açúcar é produzido. Sendo a cana-de-açúcar uma cultura de ciclo longo, o estudo das relações hídricas e das respostas fotossintéticas nesses estágios de crescimento, depois de aproximadamente 90 dias de seca, ajuda na identificação de genótipos tolerantes (SILVA, 2007).

Alguns aspectos morfológicos de fácil mensuração e que afetam diretamente a produtividade, como altura, diâmetro e massa de colmos são usados para avaliar a tolerância de variedades de cana-de-açúcar sob condições de déficit hídrico acentuado. De acordo com SILVA et al. (2008), padrões considerados resistentes à seca apresentam maior produtividade, número de colmos, altura e massa do que padrões sensíveis à deficiência de água no solo. Só o diâmetro é maior em padrões sensíveis ao estresse hídrico e este aspecto não apresenta uma correlação direta com as características de produtividade desejadas. Ainda segundo o autor, essas informações, excetuando-se o diâmetro do colmo, possuem correlação positiva e podem ser usadas pelos melhoristas vegetais para selecionar genótipos que sejam produtivos mesmo sob condições hídricas adversas.

Outras mudanças morfológicas comuns à cana-de-açúcar, quando submetida a um déficit hídrico, são a redução da área foliar e da espessura das folhas e um aumento proporcional das raízes. A diminuição do volume e um espessamento da parede celular também são mudanças anatômicas que ocorrem já no início do processo de aclimação vegetal (HUSSAIN et al., 2004).

Além da análise direta de alguns aspectos morfológicos, determinados métodos rápidos e indiretos de quantificação podem ajudar nesse processo de identificação de genótipos tolerantes à seca. Métodos laboriosos e pouco práticos como a análise da troca gasosa vêm sendo substituídos por métodos mais simples entre eles o de medida da atividade fotossintética, avaliando-se a razão F_v/F_m , e o que estima o conteúdo de clorofila (índice SPAD) (SILVA, 2007). A temperatura foliar é outro parâmetro fisiológico também usado para a diferenciação entre variedades tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico. Técnicas quantitativas realizadas por aparelhos portáteis *in loco*, como

as fluorométricas, apresentam vantagens essenciais com relação a outros métodos tradicionais de análise fisiológica vegetal, devido à rapidez e facilidade de execução e por apresentarem em sua maioria uma característica não destrutiva, possibilitando posterior utilização do material vegetal para outras análises, se necessário (MAXWELL & JOHNSON, 2000).

2.7 Estresse por déficit hídrico e expressão gênica em cana-de-açúcar

Estudos em *Arabidopsis thaliana* mostram que a percepção inicial de déficit hídrico é mediada por uma histidina quinase transmembrana - AtHK1 – que sob condições de alta ou baixa osmolaridade, tem o gene altamente expresso nas raízes (RIERA, 2005).

A histidina quinase transmembrana faz o papel de um sensor, detectando mudanças no potencial osmótico dentro da célula e disparando a indução de genes relacionados ao estresse hídrico. Após esta primeira percepção das mudanças osmóticas pelo osmossensor, a tradução do sinal envolve fosforilação e desfosforilação mediadas por proteínas quinases e fosfatases. Num terceiro momento, estas respostas seguem em dois caminhos distintos, envolvendo ou não a ação do Ácido Abscísico. Quando o Ácido Abscísico está envolvido, sua acumulação ativa vários genes relacionados, que podem resultar produtos funcionais, como as “aquaporinas”, ou regulatórios, como proteínas quinases. O outro caminho, que não depende de Ácido Abscísico, não está totalmente esclarecido. (CHAVES, 2003).

Segundo Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (2005), estudos feitos em *Arabidopsis thaliana* mostram que existe uma significativa relação entre as vias de respostas aos variados estresses, principalmente as relacionadas ao déficit hídrico, alta salinidade e resposta ao Ácido Abscísico. Essas pesquisas também demonstram que os genes envolvidos na resposta à redução da disponibilidade de água podem ser classificados em dois grupos. O primeiro deles, já citado como um grupo de proteínas funcionais, inclui canais hídricos, transportadores, enzimas desintoxicantes, fatores de proteção de macromoléculas (proteínas *Late Embryogenesis Abundant* – LEA - e chaperonas), enzimas para biossíntese de osmólitos (prolina e açúcares) e proteases. Já o segundo contém proteínas regulatórias como fatores de transcrição, proteínas quinases, fosfatases e de biossíntese (SINGH et al., 2002; JANGPROMMA et al. 2010).

Em cana-de-açúcar, sob condições de estresse hídrico, a síntese de *Heat Shock Proteins (HSP)*, peroxidases e proteínas envolvidas no transporte de água e processos de proteólise tem sido observada. Mudanças bioquímicas resultantes do déficit hídrico envolvem uma complexa rede de sinalização celular que requer, em similaridade com as pesquisas em *Arabidopsis thaliana*, fatores de transcrição, proteínas, quinases e fosfatases, os quais disparam a expressão ou regulação de genes-alvo. Fitormônios como o Ácido Abscísico (ABA) aparentam ter um importante papel na mediação da sinalização e no processo de regulação desses genes (ZHU, 2002; RODRIGUES et al., 2009).

Heat Shock Proteins (HSP) estão envolvidas na proteção celular contra danos causados por mudanças físicas ou químicas na homeostase de diversos organismos, por isso são também conhecidas como *stress proteins* ou ainda como chaperonas moleculares. Muitas dessas proteínas necessitam de cofatores, chamados co-chaperonas, que auxiliam as chaperonas nas suas funções. Algumas co-chaperonas também agem diretamente, como as próprias chaperonas. A função principal destas proteínas é a manutenção da conformação de outras proteínas, inclusive daquelas recém-formadas, regulando o enovelamento e impedindo a agregação protéica. Durante uma condição de estresse existe o risco da expressão gênica normal sofrer grandes consequências, atingindo moléculas e processos importantes para a atividade celular, como a estabilidade do RNA e seu processo de tradução, alterações no citoesqueleto, dentre outros. Por estarem sempre sujeitas a condições de estresse e em constante adaptação às condições ambientais adversas, as plantas possuem uma complexa rede de genes que codificam várias proteínas *HSP* e a expressão dessas proteínas é um fator essencial para a tolerância vegetal a essas condições de estresse (LIBEREK et al., 2008; HUANG & XU, 2008; SREEDHAR et al., 2010; ZHICHANG et al., 2010).

A prospecção de genes específicos ligados à resistência à seca tem surtido bons resultados. Como esse tipo de resistência pode ocorrer devido ao acúmulo de prolina, a identificação do gene *P5CS* em cana-de-açúcar, codificante da enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase, é um sinal positivo para a característica de resistência a esse estresse abiótico. Essa enzima é responsável por duas conversões na via biossintética da prolina, o que a torna um fator limitante para a produção desse aminoácido. Uma via biossintética alternativa utiliza a enzima ornitina aminotransferase. Minarsih, et al. (2001) identificaram a presença do gene endógeno *P5CS* em cana-de-açúcar, que apresenta uma região conservada com alta homologia com relação a genes *P5CS* de

outras espécies de plantas, e proporcionaram a possibilidade de estudos mais profundos de resistência à seca por intermédio da modificação da via biossintética da prolina ligada a expressão desse gene.

A tolerância à desidratação em plantas transgênicas tem sido conseguida por meio da transferência de genes induzidos por estresses abióticos. São genes que codificam enzimas reguladoras da biossíntese de aminoácidos como a prolina, citada acima, aminas quaternárias (ex.: poliaminas e glicinobetaína), açúcares (ex.: manitol, trealose, galactinol e rafinose) e proteínas específicas como *HSP* e *LEA*, sendo que estas últimas estão intimamente ligadas à desintoxicação celular durante o processo de desidratação. Analisar as funções dos diversos genes expressos sob condições adversas às plantas é essencial para que os estudiosos da área de manipulação genética entendam os mecanismos moleculares que governam as respostas vegetais aos diversos tipos de estresses (SHINOZAKI et al., 2005).

2.8 Análise de expressão gênica diferencial – *real-time* RT-PCR

A tecnologia conhecida como *Polimerase Chain Reaction* – PCR – é utilizada para copiar e amplificar a quantidade de DNA em uma amostra. Ela emprega DNA polimerases que possibilitam a amplificação de pedaços específicos de DNA por meio da adição de oligonucleotídeos com sequências específicas e conhecidas na reação, que após anelamento com o DNA molde serão reconhecidos pelas polimerases e servirão como iniciadores da reação em cadeia. Esses oligonucleotídeos são comumente denominados *primers*. A enzima rotineiramente usada nas análises de PCR é a *Taq* DNA polimerase, oriunda do microrganismo *Thermus aquaticus*; contudo outras enzimas podem substituí-la, sendo que todas elas devem possuir duas capacidades básicas para serem empregadas: 1) gerar novas fitas de DNA a partir de um DNA molde e *primers* e 2) ser resistente ao aquecimento. O segundo requisito é imprescindível, porque após cada etapa de cópia do DNA, formando dsDNA, ele será novamente separado em fitas simples, ssDNA, por meio de altas temperaturas que giram em torno de 95°C, para que, após resfriamento, novas moléculas de *primers* possam anelar, a polimerase consiga trabalhar no alongamento das fitas e o processo seja repetido, constituindo verdadeiros ciclos. Obtendo-se uma eficiência perfeita no processo, pouco vista na prática, a cada ciclo a quantidade de dsDNA específico é duplicada, num

aumento exponencial, facilitando análises ou etapas posteriores no estudo dos ácidos nucleicos (VALASEK & REPA, 2005).

Existe uma polêmica histórica quanto ao potencial quantitativo da técnica de PCR. Isso se deve ao fato de que os dois primeiros livros falando sobre essa ferramenta analítica não mencionavam o termo quantificação. No entanto, com o passar dos anos, verificou-se que a técnica de PCR pode ser utilizada em análises quantitativas quando alguns fatores que interferem nessa capacidade, como a otimização da etapa de amplificação, a temperatura inicial de reação e a faixa de amplificação linear, são devidamente controlados. Dessa forma, executando o controle das variáveis com cuidado, o método de PCR pôde ser equiparado a outras técnicas quantitativas como *Northern blot* e com metodologias que utilizam hibridização *in situ* (FERRE, 1992).

Uma variação da técnica PCR é a *real-time* PCR, capaz de quantificar os produtos de PCR a cada ciclo pela utilização de substâncias fluorogênicas que são ligadas às moléculas de ácido nucleico e o conjunto é monitorado em tempo real, como o próprio nome da metodologia sugere. A *real-time* PCR possui grandes vantagens quando comparada com a técnica que a originou, como por exemplo: os produtos obtidos sofrem uma menor manipulação, o risco de contaminação é reduzido e a velocidade analítica é muito maior, além de ser bem menos laboriosa. Devido a essas vantagens e ao fato de ser uma técnica com alta eficiência, o uso da *real-time* PCR se difundiu rapidamente nos laboratórios de pesquisa gênica (HEID et al. 1996).

Atualmente a técnica *real-time* PCR é uma potente e rotineira ferramenta de análise de expressão gênica e quantificação e também apresenta muitas vantagens quando comparada com outras técnicas. A sensibilidade da técnica é uma dessas vantagens; estima-se que a análise por *real-time* PCR é 10.000 a 100.000 vezes mais sensível que métodos por ensaios de proteção com RNase e 1.000 vezes mais sensível que a hibridização *dot blot*. A pequena quantidade de amostra necessária para a reação também é um fator positivo na escolha dessa técnica quantitativa. Por outro lado, a maior desvantagem dessa tecnologia é o alto preço de seus reagentes e equipamentos (WONG & MEDRANO, 2005).

Entre os diversos pontos que devem ser observados durante a análise por *real-time* PCR, a normalização dos dados de expressão gênica é considerada fundamental para o sucesso da quantificação. Essa normalização é realizada para que haja o controle das variações intrínsecas à técnica, tais como diferenças entre os tecidos analisados ou o número de células analisadas, diferenças na integridade ou quantidade de RNA e

tratamentos experimentais específicos na amostra. Geralmente essa normalização é feita tomando-se um gene como referência, preferencialmente um gene constitutivo, o chamado *housekeeping*, que serve como um controle positivo da reação. A escolha desse gene de referência depende de fatores como o tipo de tecido ou célula analisada, estágio de desenvolvimento desse tecido ou ainda de etapas analíticas exclusivas a uma metodologia que interferem nas características da amostra tecidual (VANDESOMPELE, 2002; WONG & MEDRANO, 2005; HUGGETT et al.; 2005; BOWER et al, 2007).

Genes *housekeeping* codificam proteínas essenciais para a manutenção celular, como componentes do citoesqueleto (β -actina, α - e β -tubulina) ou enzimas da via glicolítica (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase – GAPDH). Sendo codificadores de proteínas essenciais, geralmente assume-se que esses genes são expressos em níveis similares em diferentes tipos de células e isso é o fator primordial para a escolha de um gene que servirá como um padrão interno na análise quantitativa de ácidos nucléicos. Alguns critérios são levados em consideração nessa seleção, tais como: definição do material da amostra que será utilizado na quantificação do gene de interesse, identificação em literatura de genes *housekeeping* que não sejam regulados e, conseqüentemente, não apresentem variação no tipo de tecido analisado, pesquisa de *primers* RNA-específicos que garantam uma amplificação livre de DNA, entre outros (THELLIN et al., 1999; ROCHE APPLIED SCIENCE, 2001; 2002; SZABO et al., 2004).

O fator que mais limita a técnica de PCR é a impossibilidade de se obter um processo semelhante de amplificação exponencial a partir de ácidos nucléicos com fita simples. Dessa forma, moléculas de RNA não são amplificadas da mesma maneira que dsDNA, o que restringiria consideravelmente as pesquisas voltadas à expressão gênica. A forma encontrada pelos estudiosos para contornar esse empecilho foi a utilização de uma outra enzima proveniente de algumas espécies de retrovírus, a transcriptase reversa. Essa enzima é usada em laboratório para converter mRNA em cDNA que então pode ser utilizado para muitas finalidades, inclusive nas metodologias baseadas na técnica PCR, por meio de *primers* (BUSTIN, 2002). Quando o cDNA assim obtido é analisado por *real-time* PCR, uma nova denominação para a técnica é aplicada: *real-time* RT-PCR. Por apresentar uma grande precisão e sensibilidade, essa técnica é capaz de detectar mudanças mínimas na expressão de um gene, tornando-a uma potente e confiável ferramenta analítica nas pesquisas onde expressões diferenciais são o foco

(VALASEK & REPA, 2005). O uso da transcrição reversa seguida de reação de PCR possibilita a análise de mRNA em diversos tipos de tecidos. Nessa técnica é usado um agente ligante, o *SYBR Green*, que se apresenta fluorescente quando ligado à cadeia de DNA. Em cada etapa de expansão da técnica de PCR, mais *SYBR Green* se liga, fazendo com que o sinal detectado pelo aparelho se torne mais forte a cada ciclo. Nessa técnica também é feita uma normalização utilizando-se um gene de referência. O gene de referência serve como um padrão interno para o monitoramento e permite a quantificação relativa do gene-alvo (BUSTIN, 2000; PFAFFL, 2001; ISKANDAR et al., 2004).

Uma das aplicações da tecnologia *real-time* RT-PCR é a análise de genes diferencialmente expressos entre variedades de cana-de-açúcar resistentes e sensíveis ao estresse abiótico por déficit hídrico, quando estas são submetidas experimentalmente a uma supressão controlada do suprimento de água em casa de vegetação. Esse tipo de estudo possibilita a identificação e/ou comprovação de variedades que suportem as adversidades climáticas relacionadas à deficiência hídrica, comum em algumas regiões de países tropicais ou sub-tropicais, como o Brasil, e permite também a prospecção de genes candidatos responsáveis por essa resistência. Os resultados dessa espécie de pesquisa podem ser utilizados para a obtenção de novas variedades com essa importante característica agrônoma e industrial, seja por meio do melhoramento genético tradicional ou pela produção de organismos geneticamente modificados (RODRIGUES et al., 2009).

3. CAPÍTULO 1 - ARTIGO CIENTÍFICO

(A ser submetido à publicação)

Revista: *Theoretical Applied Genetics*

Análise de expressão gênica diferencial em genótipo de cana-de-açúcar tolerante ao estresse hídrico, usando *real-time* RT-PCR

Júlio César Farias de Andrade^{a, *}, José Vieira Silva^c, Tiago Gomes de Andrade^b, Cícero
C S Almeida^a

^aLaboratório de recursos genéticos, Universidade Federal de Alagoas, Campus
Arapiraca, Brasil.

^bLaboratório de biologia molecular e expressão gênica, Universidade Federal de
Alagoas, Campus Arapiraca, Brasil.

^cLaboratório de fisiologia vegetal, Universidade Federal de Alagoas, Brasil.

Contato: Campus Arapiraca, Universidade Federal de Alagoas, Arapiraca, AL, Brasil,
Avenida Manoel Severino Barbosa s/n, Rodovia AL 115, km 6,5. Bairro Bom Sucesso,
57300-970. E-mail: cicerocarlos@hotmail.com

1. Introdução

Os primeiros clones cultivados de cana-de-açúcar foram oriundos do cruzamento entre *Saccharum officinarum* e *S. spontaneum* no início do século passado, que após seguidos retrocruzamentos com *S. officinarum* resultou nos cultivares modernos. Esses cultivares possuem $2n = 100-130$ cromossomos, com aproximadamente 80% derivados de *S. officinarum* e 20% de *S. spontaneum* (Tomkins et al., 1999; Grivet e Arruda, 2001; Hoarau et al., 2001; 2002).

A cana-de-açúcar representa uma importante cultura por representar cerca de 65% da produção de açúcar do mundo. Além do açúcar, o etanol derivado da cana-de-açúcar vem sendo considerado um combustível renovável alternativo ao petróleo (Carson e Botha, 2002; Felix, 2004). As plantas cultivadas estão sujeitas a condições abióticas, sendo o déficit hídrico o que causa a maior perda na agricultura, devido aos efeitos morfofisiológicos como diminuição da fotossíntese e inibição do crescimento. Essas condições têm estimulado os programas de melhoramento a desenvolver novas variedades de cana-de-açúcar, buscando o aumento na eficiência do uso da água (Yordanov et al., 2000; 2003; Molinari, 2006; Silva et al., 2008; Ghannoum, 2009).

Os mecanismos de resposta das plantas aos estresses abióticos e suas influências na obtenção da tolerância desses vegetais a essas condições adversas é de grande importância para a agricultura. Nesse contexto, o estudo da expressão gênica é considerada um novo paradigma para o melhoramento de plantas. O estudo específico de genes responsáveis por características agrônômicas é de suma importância para o entendimento das modificações das funções e desempenho de plantas cultivadas, além de possibilitar um acréscimo na eficiência em estudos tradicionais de melhoramento (Xiong, Schumaker e Zhu, 2002; Casu et al. 2005; Wang et al, 2004; Borges et al., 2001; Vettore et al., 2001). A busca por variedades vegetais capazes de suportar as mudanças climáticas globais naturais e antropogênicas é fundamental para garantir a produção de alimentos e, conseqüentemente, a sobrevivência humana em ambientes hostis à agricultura.

O objetivo deste trabalho foi analisar os aspectos fisiológicos e a expressão gênica, esta por meio da técnica *real-time* RT-PCR, em tecido foliar de um genótipo de cana-de-açúcar tolerante à pouca disponibilidade de água, submetida ao déficit hídrico severo. Os parâmetros fisiológicos estudados no acesso RB72910 foram comparados com os da variedade sensível ao estresse hídrico, RB72454.

A escolha do tecido vegetal e dos genes analisados foi feita com base no trabalho de Rodrigues et al. (2009), onde os genes foram usados para validar a análise por macroarray em variedades de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico. São genes relacionados à proteção vegetal e à homeostase em situações adversas causadas por agentes bióticos e abióticos. Entre eles estão os genes *DNAJ* e *ZmTIP4-2*, ligados à osmorregulação vegetal, *PGR5* e *PSI*, envolvidos no processo de fotoproteção e transporte de elétrons e o gene *SAMDC*, que codifica a enzima-chave da via biossintética das poliaminas, associadas ao crescimento e diferenciação das plantas e à manutenção do metabolismo sob condições de estresse hídrico. O gene de referência utilizado na análise *real-time* PCR foi o da β -tubulina.

2. Material e métodos

2.1 Experimento de estresse hídrico

A cultivar de cana-de-açúcar RB72910, classificada pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar/RIDESA como tolerante ao estresse hídrico, baseado em dados fisiológicos e de produtividade em campo experimental, foi cultivada em casa de vegetação sob condições médias de 63,9% de umidade relativa do ar e 31,9°C de temperatura por 64 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e com uma planta por vaso com capacidade para 15 kg. As plantas foram submetidas ao cultivo com 80% (controle) e 20% (estresse severo) de água disponível no solo. Após 64 dias de crescimento vegetal, o estresse hídrico foi estabelecido por meio da supressão da irrigação. A análise da umidade do substrato no controle e no estresse severo foi realizada por meio de método gravimétrico. As plantas do tratamento controle foram mantidas com irrigação. Após quatro dias de estresse, foram coletadas folhas das plantas submetidas ao controle e ao estresse severo. O material coletado foi armazenado imediatamente em caixa térmica contendo nitrogênio líquido e transferido para ultrafreezer a -86°C até o momento das análises.

Para avaliar o estado de estresse hídrico das plantas submetidas aos tratamentos, foram feitas análises fisiológicas de eficiência fotossintética (F_v/F_m), por meio de flourômetro portátil de luz modulada (modelo Opti-Sciences, modelo OS1-FL, Hudson, USA), e de condutância estomática (A) e taxas fotossintética (E) e de

transpiração (gs), empregando o equipamento IRGA, com fluxo de ar de 300 mL min^{-1} e fonte de luz acoplada de $995 \text{ mmol}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (ADC, modelo LCI, Hoddesdon, UK), segundo as instruções dos manuais dos fabricantes dos equipamentos. As variáveis foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas usando teste t a 5% de probabilidade de erro, por meio do programa R (R Development Core Team 2005). Para controle experimental, um genótipo não tolerante ao estresse hídrico (RB72454) foi submetido aos mesmos tratamentos e avaliado com as mesmas variáveis.

2.2 Extração do RNA e síntese do cDNA

O RNA total das amostras foliares foi extraído de todas as plantas em cada tratamento utilizando TRIzol[®] Reagent, seguindo as instruções dos fabricantes. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se $12 \mu\text{g}$ do RNA total extraído, 1X *First-Strand*, 40 unidades da enzima Transcriptase Reversa AMV (20units/ μL). A reação foi incubada a 42°C por 1 hora e 30 min.

2.3 Real-time RT-PCR

A reação de *real-time* PCR foi realizada usando-se *SYBR Green Master Mix* (Fermentas) e um termociclador ABI 7500. Para normalizar a expressão relativa dos genes, o gene β -tubulina (CA222437) foi usado como referência. Foram utilizados 11 *primers* do trabalho de Rodrigues et al. (2009), descritos na Tabela 2. Para cada gene, foram utilizadas três replicatas e analisadas independentemente e cada reação foi constituída de 65ng de cDNA, 25nM de *primer*, $12,6 \mu\text{L}$ de *SYBR Green Master Mix* e completado o volume para $25 \mu\text{L}$. A amplificação foi feita usando 50°C por 2min, 95°C por 10min e 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min.

Tabela 2 – Ct de expressão diferencial dos genes usados na *real-time* RT-PCR; acesso RB72910

Acesso ^a	Genes ^b	Expressão ^c		Função
		Controle	Estresse hídrico	
CA222437	β -tubulina	32,4	30,7	<i>housekeeping</i>
CA127376	<i>SAMDC</i>	25,9	25,1	osmorregulação
CA120560	Proteína <i>ZmPIP2-1</i>	34,5	31,0	turgescência
CA128872	Proteína <i>ZmTIP4-2</i>	28,2	28,0	homeostase
CA127367	Proteína <i>WIP</i>	32,2	28,7	reparo tecidual
CA119309	Proteína <i>LTP</i>	34,3	31,6	impermeabilização
CA116806	Histona	26,9	25,7	silenciamento gênico
CA300174	<i>DNAJ</i>	30,3	31,6	osmorregulação
CA293774	Ferredoxina I	26,9	27,1	transporte de elétrons
CA116652	Fotossistema I	25,2	24,4	transporte de elétrons
CA122935	Gene 1	27,3	26,5	-----
CA129393	Gene 2	32,6	33,2	-----

^a Número do acesso no banco de dados do NCBI.

^b Oriundo de RODRIGUES et al. (2009).

^c Ct da expressão diferencial.

3. Resultados

3.1 Análises de fisiologia Vegetal

A análise estatística para as variáveis mostrou uma interação significativa ($P \leq 0,05$) entre as variedades e condição hídrica, indicando que as variedades possuem diferenças para tolerância ao estresse hídrico. Os resultados médios correspondentes à taxa de transpiração foliar (E) da variedade controle RB72454 variaram de 3,01 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ a 0,18 mmol H₂O m⁻² s⁻¹, enquanto que na variedade RB72910 os valores encontrados foram de 2,09 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ e 0,78 mmol H₂O m⁻² s⁻¹, sendo que os valores maiores correspondem à condição de capacidade de campo e os menores aos valores sob estresse por supressão hídrica (Figura 1A).

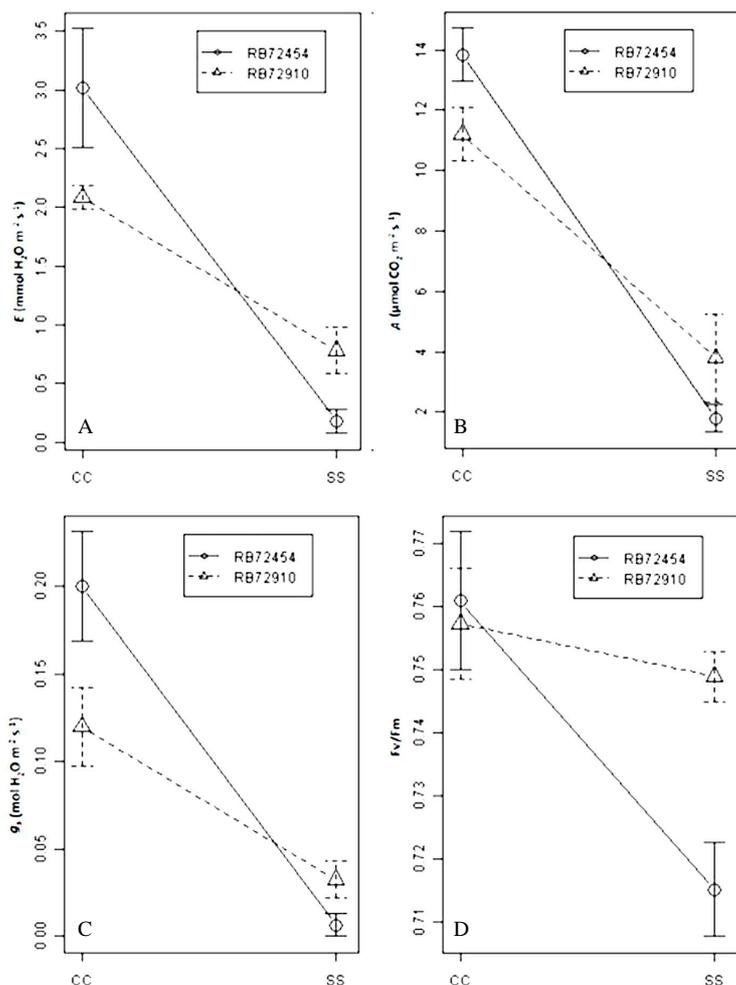


Figura 1 – Resultados médios das análises de fisiologia para o tratamento controle (CC) e estresse hídrico (SS). *E* (transpiração foliar), *A* (fotossíntese líquida), *g_s*(condutância estomática) e *F_v/F_m* (eficiência fotossintética).

Para a variável fotossíntese líquida (*A*) os genótipos apresentaram valores observados no tratamento controle de $13,85 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $11,20 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para as variedades RB72454 e RB72910, respectivamente. Na condição de estresse, esse mesmo parâmetro foi de $1,78 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $3,78 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 1B).

Um decréscimo acentuado foi notado na condutância estomática (*g_s*) quando as plantas foram comparadas em situação de capacidade de campo e déficit hídrico, semelhantemente às outras análises fisiológicas (Figura 1C). Os valores médios mensurados foram $0,20 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para a variedade sensível (RB72454) e $0,12 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para a variedade RB72910 no tratamento controle. Para o tratamento de estresse hídrico, foram observados valores de $0,007 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $0,032$ para as variedades RB72454 e RB72910, respectivamente.

O rendimento quântico da fluorescência da clorofila *a* (F_v/F_m) nas variedades RB72454 e RB72910 foi quantificado indiretamente pela emissão da clorofila *a* por flourometria nas condições estudadas. Os resultados obtidos mostraram que a variedade RB72454 apresentou uma queda mais acentuada para esse parâmetro que a RB72910, com valores médios no tratamento controle de 0,76 (RB72454) e de 0,76 (RB72910) e no tratamento de estresse severo 0,71 (RB72454) e 0,75 (RB72910) (Figura 1D).

3.2 Análises por *real-time* RT-PCR

Os resultados da análise por *real-time* RT-PCR mostraram que houve uma expressão diferencial entre os tratamentos realizados no genótipo RB72910. O perfil desta expressão para os 11 genes estudados é mostrado na Figura 2. Os genes analisados estão envolvidos em diversas funções de proteção vegetal contra estresses causados por fatores bióticos e abióticos.

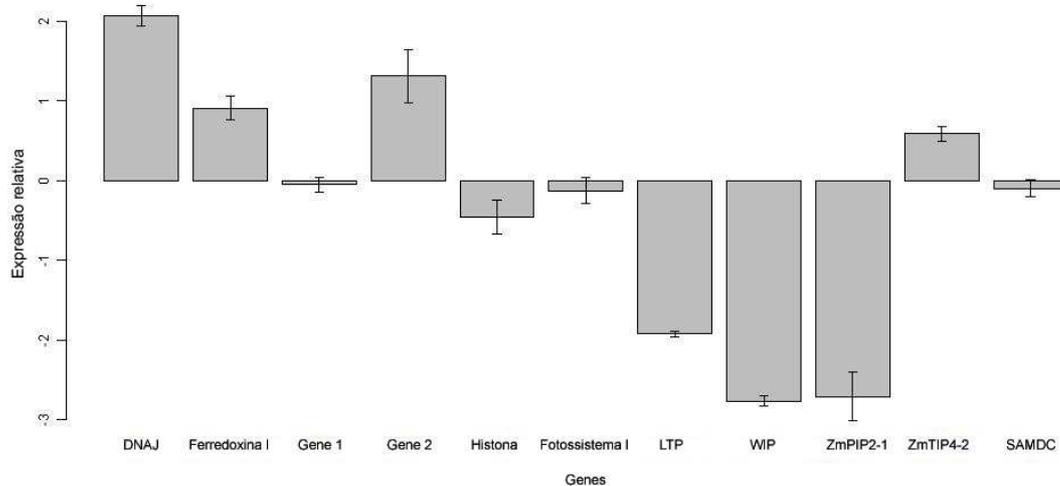


Figura 2 – Expressão diferencial de 11 genes no genótipo RB72910 sob estresse hídrico severo. Padrão de expressão baseado no gene de referência da β -tubulina.

Os genes *DNAJ* e ferredoxina (*PGR5*), relacionados à fotoproteção sofreram indução diante do tratamento de estresse severo. Da mesma forma, o gene *ZmTIP4-2*, responsável pela expressão de proteínas do tipo aquaporinas, foi superexpresso. Outro gene ligado ao processo fotossintético, o do fotossistema I, diferentemente dos outros,

sofreu uma pequena queda na sua expressão. O *gene 2* também apresentou aumento de expressão quando comparado ao tratamento controle.

A expressão de genes relacionados às histonas foi reduzida na condição de estresse hídrico, semelhantemente aos de defesa (*LTP*), de regulação da homeostase (*WIP* e *SAMDC*) e de crescimento e regulação estomática (*ZmPIP2-1*). O *gene 1* também apresentou redução na sua expressão.

4. Discussão

Análises indiretas e não destrutivas de fisiologia vegetal vêm sendo utilizadas nas mais diversas culturas para a identificação de genótipos tolerantes ou sensíveis a estresse por déficit hídrico. Dentre as análises estão aquelas baseadas principalmente na verificação e quantificação de distúrbios causados por injúrias aos fotossistemas das plantas quando submetidas a condições de estresse abiótico. Tais estudos têm sido aplicados com o mesmo sucesso na prospecção de variedades de cana-de-açúcar com a importante característica agrônômica e industrial de resistência à seca (Guo et al., 2009; Grzesiak et al., 2007).

Os resultados obtidos nas análises fisiológicas são similares aos publicados por Silva et al., em 2007, para variedades resistentes e sensíveis de cana-de-açúcar, e corroboram os estudos realizados por Mahajan e Tuteja, 2005, Zamperlini et al., 2008 e Melo et al. 2010, onde variáveis fisiológicas foram descritas e discutidas quando diferentes espécies vegetais (*Arabidopsis thaliana*, *Ananas comocus* e *Citrulus lanatus*) estavam sob condições de estresse hídrico, mostrando a consistência científica dos resultados descritos neste estudo.

Analisando os efeitos do déficit hídrico entre as variedades, verificou-se que as variáveis fisiológicas de trocas gasosas, condutância estomática, transpiração e fotossíntese, de modo geral, apresentaram redução após a implantação do estresse hídrico, variando apenas em intensidade, sendo esta maior para a variedade sensível (RB72454) do que para a considerada tolerante (RB72910) (Figura 1). Dentro de cada variedade, a diminuição dos valores dessas variáveis também foi observada, porém os resultados mostraram que a supressão hídrica foi mais danosa para a variedade RB72454 do que para a RB72910 com interação significativa ($P \leq 0,05$), sugerindo que essa última variedade apresenta maior tolerância ao estresse hídrico.

A redução da condutância estomática por fechamento dos estômatos é uma das primeiras respostas em variedades de cana-de-açúcar sensíveis a estresse por diminuição da disponibilidade hídrica. Como consequência deste fechamento, a evapotranspiração sofre uma diminuição diretamente proporcional à redução da condutância estomática, tendo a finalidade de atenuar a perda de água da planta para a atmosfera. Verificou-se ainda que a assimilação de CO₂ também sofreu um decréscimo acentuado, observado pela quantificação da taxa fotossintética, igualmente resultante da redução da capacidade de trocas gasosas foliares devido ao fechamento das câmaras estomáticas (Gonçalves et al., 2009; Sperry, 2000).

A eficiência fotossintética das duas variedades, quando medida sob capacidade de campo, foi de aproximadamente 0,8, valor próximo daqueles obtidos em folhas saudáveis em várias espécies vegetais (Baker, 2008). Já quando submetidas ao estresse hídrico, essa eficiência sofreu um decréscimo, que foi significativamente maior na variedade sensível RB72454 (Figura 1D), resultado similar ao obtido nos estudos de Silva et al., em 2007, onde foi salientado ainda que a capacidade de um vegetal de manter a razão F_v/F_m mesmo em condições adversas de umidade do solo é um indicativo para alta eficiência no uso da radiação nos processos fotossintéticos.

Tais resultados são expressivos e foram suficientes para comprovar que o procedimento inicial de supressão da irrigação foi eficiente para causar estresse por déficit hídrico, condição fundamental para a análise de expressão gênica diferencial por *real-time* RT-PCR da variedade tolerante de cana-de-açúcar nos tratamentos realizados.

Os resultados de uma análise do tipo *data mining* realizada por Borges, Peroto e Ramos (2001) no banco de dados *Sugarcane Expressed Sequence Tags* – SUCEST – demonstraram que existe uma abundante expressão de genes codificadores de chaperonas, co-chaperonas e outras proteínas ligadas à proteção contra estresse em cana-de-açúcar, sendo que foi verificada uma expressão maior e mais diversificada no citoplasma do que em outro compartimento celular. Os genes mais encontrados por estes pesquisadores foram aqueles responsáveis pela síntese da chaperona *HSP70* e seus co-fatores, como a *HSP40*, além daqueles codificadores das proteínas *HSP90*, *HSP100* e *Small HSP chaperones*. Resultados semelhantes foram obtidos em outras espécies vegetais, como em *Eucalyptus* (Cagliari et al., 2005). A expressão do gene *DNAJ* ou *HSP40* obtida pela submissão da variedade de cana-de-açúcar RB72910 ao estresse hídrico corrobora com os dados citados obtidos *in silicio*, mostrando que sob a condição

de pouca disponibilidade de água implementada durante o experimento, o gene para esta importante co-chaperona foi amplamente expresso.

As reações luminosas na fotossíntese transformam energia luminosa em energia química sob a forma de ATP, e conduzem a formação de NADH a partir de NAD^+ . Esse processo ocorre por meio de duas vias, a denominada linear, geradora de NADH e ATP, e a via cíclica de transportes de elétrons do fotossistema I, onde apenas ATP é produzido. A absorção de luz realizada pelo maquinário fotossintético do complexo II produz a excitação da molécula de clorofila e, no final, essa energia é transferida do fotossistema II para o centro de reação P680, um conjunto de pigmentos altamente oxidante. Sob condições de luminosidade intensa, um mecanismo de proteção contra a formação de moléculas reativas de oxigênio é ativado, fazendo com que a clorofila seja desexcitada por meio de um processo de dissipação térmica, desencadeado pela acidificação do lúmen do tilacóide. Esse processo evita a deletéria fotoinibição. O gene *PGR5* (do termo em inglês *Proton Gradient Regulation*) é responsável pela expressão de uma pequena proteína de membrana do tilacóide também chamada *PGR5*, envolvida na transferência de elétrons da ferredoxina I para a plastoquinona e considerada essencial para esse sistema de fotoproteção, por auxiliar no ajuste de pH do lúmen. O mecanismo exato da ação dessa proteína ainda não está devidamente esclarecido, porém foi verificado em experimentos com plantas que não codificam essa proteína que a ausência de sua expressão facilita a danificação do fotossistema I por fotoinibição (Munekage et al., 2002; Munekai e Shikanai, 2005; Shikanai, 2007).

A análise do gene *PGR5* na variedade de cana-de-açúcar RB72910 por *real-time* RT-PCR apresentou um perfil de aumento de expressão condizente com a literatura. Isso implica que essa variedade de cana-de-açúcar possui um mecanismo fotoprotetor eficiente, que pode ser um facilitador para a sua escolha em programas de melhoramento no intuito de obtenção de plantas resistentes ao estresse hídrico sob altas condições de luminosidade, como as encontradas na região Nordeste do Brasil.

A expressão dos genes 1 e 2 mostra que o primeiro não foi induzido pelo estresse hídrico, enquanto o segundo sofreu uma super-expressão sob esta condição, sugerindo que o gene 2 está envolvido em mecanismos de proteção do vegetal, similarmente às proteínas ligadas à preservação da fotossíntese na variedade RB72910. O perfil de expressão do gene 2 foi o mesmo que o obtido por Rodrigues et al. (2009) ao analisarem os mesmos genes em outros genótipos de cana-de-açúcar tolerantes e

sensíveis, enquanto a expressão do gene 1 foi oposta, ou seja, não foi induzida durante o experimento com a RB72910.

Estudos recentes evidenciam que a regulação de genes em plantas geralmente depende de modificações pós-tradução na estrutura da cromatina, e que essas modificações estão principalmente relacionadas a alterações na cauda N-terminal de histonas. As enzimas envolvidas nesse processo são denominadas “modificadoras de histonas”, e são classificadas de acordo com sua ação como: histona acetiltransferase, histona desacetilase, histona metiltransferase e histona desmetilase (Strahl e Allis, 2000; Chinnusamy, Gong e Zhu, 2008; Chinnusamy e Zhu, 2009; Kim et al., 2010). De acordo com Garcia et al. (2007), o empacotamento do DNA na cromatina é o mais eficiente mecanismo de silenciamento gênico e as modificações nas histonas é o processo pelo qual essas informações se tornam acessíveis às enzimas decodificadoras durante a expressão gênica. Devido à complexidade no número de histonas e de enzimas modificadoras, a análise de expressão gênica diferencial deve ter uma relativa profundidade para que se tenha uma especificidade na resposta, como visto no trabalho de Wierzbicki e Jerzmanowski (2005), onde os genes codificadores da histona H1 foram suprimidos e as consequências dessa supressão no desenvolvimento do vegetal e na metilação do DNA foram analisadas. O perfil de expressão de histona H1 observado sob a condição de supressão hídrica, sugere que, nesse tratamento, ocorreu uma diminuição na expressão dessa proteína, que é relacionada ao metabolismo celular.

O fotossistema I é um complexo de proteínas hidrofóbicas encontrado integralmente na membrana do tilacóide e é responsável pelo transporte dos elétrons induzidos pela luminosidade, da plastocianina à ferredoxina. Suas subunidades protéicas vão de *PSI-A* a *PSI-O* e apresentam funções distintas no transporte de elétrons. Um exemplo disso é que as unidades *PSI-C*, *PSI-D* e *PSI-E* são diretamente responsáveis pela redução da ferredoxina no estroma, processo importante na fotossíntese (Haldrup et al., 2003; Zolla et al., 2007). Estas funções podem ser afetadas negativamente em situações de estresse, prejudicando o processo fotossintético e a homeostase do vegetal. Em organismos onde a expressão de *PSI-D* foi reprimida, por exemplo, o fotossistema I se apresenta desestabilizado, o que resulta numa maior fotossensibilidade e, conseqüentemente, uma maior propensão à fotoinibição. Esse comportamento foi descrito em *Arabidopsis thaliana* por Varoto et al. (2002) e ratificado por Ichnatowicz et al. em 2004. A pequena inibição da expressão gênica para o complexo fotossistema I na variedade RB72910 aponta para uma reduzida interferência do estresse na estabilidade

desse sistema, indicando que o processo de transferência de elétrons até a ferredoxina I pode ter sofrido poucos danos apesar do déficit hídrico severo imposto às amostras, contribuindo para a manutenção do processo fotossintético mesmo sob esta condição adversa.

Lipid Transfer Proteins (LTPs) são proteínas supostamente responsáveis pela transferência de lipídios através da matriz extracelular para que haja a síntese de cera cuticular. Esse tipo de proteína está relacionado com os processos de defesa vegetal contra agentes bióticos e abióticos. A resposta dos genes *LTP* a estes agentes é complexa, com aumento e/ou diminuição da expressão sob condições adversas à integridade da planta, porém eles são normalmente induzidos por estresse hídrico, pois a biossíntese da impermeável cutina é essencial para evitar a perda de água por vias não estomáticas. Isso é um item importante para os programas de melhoramento vegetal na busca de plantas transgênicas tolerantes à desidratação (Jang et al., 2004; Cameron et al., 2006, Yeats e Rose, 2008). Abebe et al. (2010) encontraram variações na expressão de *LTPs* em cevada como resposta a estresse hídrico. Os resultados destes autores mostram a complexidade deste tipo de resposta, dando suporte à necessidade de um estudo específico sobre a expressão desse tipo de proteína de defesa em genótipos de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis a estresses abióticos.

Outro gene que necessita ser melhor estudado na variedade RB72910 é o *Wound-induced Protein (WIP)*. Normalmente os vegetais estão sujeitos a danos provenientes de ataques de herbívoros e de lesões ocasionadas por agentes abióticos. Quando o tecido vegetal é avariado, a planta responde rapidamente no sentido de restaurar a parte danificada e protegê-la de patógenos ou de novos ataques. Essa proteção é feita por meio do acúmulo de substâncias tóxicas ou anti-nutritivas, produzidas com a ajuda de enzimas peroxidases, lipoxigenases e polifenol-oxidases. O mecanismo citado fica evidente em plantas produtoras de látex. As proteínas *WIP* são as responsáveis por este tipo de ação do vegetal e o aumento da sua expressão é esperada sob condições de estresse, inclusive por agentes abióticos (Azarkan et al., 2003; Christopher et al., 2004; Takabatake et al., 2006). No entanto, Cheong et al. (2002) observaram respostas tanto de indução como de repressão de genes para proteínas *WIP* em *Arabidopsis thaliana* ao estudarem a interação transcricional para estas proteínas por ação de agentes bióticos e abióticos. De maneira similar a esse estudo, a redução da expressão gênica do gene *WIP* na variedade RB72910 também foi obtida por Rodrigues et al. (2009). Ainda segundo Cheong et al. (2002), tal diferença nas respostas

de expressão é explicada pelo fato de que as plantas não respondem apenas ativando suas defesas, mas reorganizam parcialmente o seu metabolismo para que haja uma rápida adaptação às injúrias provocadas pelos diversos tipos de estresse.

Aquaporinas são proteínas que formam canais pelos quais é possível a passagem de água de uma célula vegetal a outra, através das membranas celulares. Estes canais são importantes, juntamente com o transporte de água radial, na manutenção da homeostase celular, no aumento do volume celular, na conservação do turgor durante a fase de expansão celular, na abertura e fechamento dos estômatos, na nutrição do vegetal e na movimentação foliar. Essas proteínas pertencem à família protéica *Major Intrinsic Protein*, encontrada em todos os seres vivos, porém são especialmente abundantes nas plantas superiores. Em alguns casos, estes canais dão passagem a outros tipos de solutos não polares, como glicerol, uréia e gás carbônico (Biernet et al., 2006; Maurel, 2007; Heinen et al., 2009). Cinco subfamílias de aquaporinas são descritas, de acordo com as semelhanças nas sequências de DNA: *Plasma Membrane Intrinsic Proteins (PIPs)*, *Tonoplast Intrinsic Proteins (TIPs)*, *Nodulin 26-like Intrinsic Proteins (NIPs)*, *Small Basic Intrinsic Proteins (SIPs)* e *X Intrinsic Proteins (XIPs)* (Sakurai et al., 2008; Danielson e Johanson, 2008). As aquaporinas avaliadas para o acesso RB72910 foram das subfamílias *PIP (ZmPIP2-1)* e *TIP (ZmTIP4-2)*. Segundo Rodríguez-Perez (2006), as aquaporinas são expressas preferencialmente quando as células vegetais estão em alongamento, devido à necessidade de uma turgescência adequada das células dos tecidos em expansão, o que permite um crescimento induzido a favor de gradientes de potenciais hídricos. Além disso, Hachez et al. (2008) comprovaram, em estudos em *Zea mays*, que a expressão do gene *ZmPIP2-1* não é só detectada nas células-guarda estomáticas, mas também em células acessórias adjacentes, importantes para a fisiologia de abertura dos estômatos. Desta forma, a inibição da expressão do gene *ZmPIP2-1* encontrada no tecido foliar da variedade em estudo foi harmônico com essas afirmativas e com os resultados de fisiologia vegetal supracitados, sugerindo que houve uma diminuição da expressão desse gene ocasionada pela necessidade de fechamento dos estômatos e de redistribuição da água usada normalmente no processo de expansão celular, pouco provável de acontecer sob condições de déficit hídrico severo. Já o aumento da expressão do gene da aquaporinas de membranas vacuolares, *ZmTIP4-2*, é um indicativo de que o estresse hídrico ampliou a necessidade dessas proteínas nos feixes vasculares, pois, ainda segundo Hachez et al. (2008), uma expressão maior dessas proteínas no tecido foliar está intimamente ligada a

um aumento também nestes feixes vasculares, no sentido de se evitar os processos de cavitação e embolismo no xilema, mantendo a regularidade da transpiração do vegetal mesmo em condições hídricas adversas.

Poliaminas são geralmente amplamente produzidas ou acumuladas sob estresse hídrico, indicando que estas moléculas possuem a função de proteção quando espécimes vegetais são submetidos a condições de déficit hídrico. A enzima-chave para a via biossintética das poliaminas, a S-adenosilmetionina descarboxilase, é um produto do gene *SAMDC*. Esta enzima é responsável pela conversão da S-adenosilmetionina em espermidina e espermina. Essas duas poliaminas juntamente com a diamina precursora putrescina, oriunda do aminoácido arginina pela ação da enzima arginina descarboxilase, são associadas à tolerância das plantas à seca, agindo como um mecanismo osmorregulador minimizando os efeitos deletérios da perda de água. Tais aminas são alifáticas e carregadas positivamente em pH fisiológico. Esta propriedade faz com que seja possível a ligação com macromoléculas negativamente carregadas, como os ácidos nucleicos, proteínas e fosfolipídios, agindo como reguladoras das propriedades químicas e físicas de membranas, da estrutura dos ácidos nucleicos e como moduladoras da ação de enzimas. Estão presentes em várias etapas do crescimento e diferenciação das plantas, porém o acúmulo é evidente quando existe uma condição desfavorável à manutenção da homeostase dos vegetais, como o estresse hídrico (Fumis e Pedra, 2002; Bruce et al., 2002; Ge et al., 2006; Groppa e Benavides, 2008).

O resultado observado neste estudo para o gene *SAMDC* (CA127376) foi um pequeno decréscimo de sua expressão na amostra de cana-de-açúcar submetida ao déficit hídrico. Em plantas susceptíveis à supressão hídrica é esperado um aumento da expressão dos genes ligados à biossíntese das poliaminas espermidina e espermina, como evidenciado nas pesquisas realizadas por Capell, Bassie e Christou, em 2004 e Bessie e Christou, em 2005. A manutenção do nível desses genes mesmo em condições hídricas desfavoráveis é um forte indício de tolerância da variedade RB72910 ao estresse hídrico por diminuição da oferta de água no solo, por indicar que a variedade não necessitou aumentar a quantidade de proteínas osmoreguladoras de proteção para atenuar os efeitos adversos da desidratação.

Alcázar et al. (2006) descreveram a complexidade da resposta molecular dos vegetais aos diversos tipos de estresse, mostrando a necessidade de um estudo diferenciado para cada tipo de gene *SAMDC* (*I, II, III e IV*), entre outros, pois vários experimentos demonstram que é possível a indução ou a repressão de um dos tipos

devido a um estresse específico, além de respostas diferentes também nas concentrações das poliaminas e da putrescina em função dessa expressão gênica. Peremarti et al. (2008) ratificaram essa necessidade ao estudarem o acúmulo foliar da putrescina e das poliaminas e a indução de resistência à seca em plantas transgênicas de arroz por meio da indução de genes *SAMDC*.

Os parâmetros de fisiologia vegetal e de expressão gênica discutidos acima indicam que o genótipo de cana-de-açúcar RB72910 possui características de uma variedade tolerante a um rigoroso déficit hídrico e ratificam as observações experimentais de campo. A principal característica de interesse agrônomo observada neste estudo foi a sua capacidade fotoprotetora, que conserva o complexo fotossintético capaz de manter sua eficiência mesmo sob baixa disponibilidade hídrica do solo, temperatura média superior a 30°C, umidade relativa média do ar inferior a 65% e alta luminosidade, condições facilmente encontradas nas regiões tropicais. Além desta importante característica, a variedade RB72910 ainda apresentou um alto poder adaptativo ao regular positivamente seu metabolismo à condição de estresse hídrico.

Diante do que foi discutido, a variedade RB72910 deve ser considerada uma fonte genética para programas de melhoramento, como doadora de genes em experimentos de transgenia para desenvolvimento de variedades tolerantes à seca.

Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Dr. Luis Antônio Ferreira da Silva, Laboratório Forense e Diagnóstico Molecular, pelo uso do equipamento ABI 7500, à Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA - Tabuleiros Costeiros), pelo uso da casa de vegetação e à Universidade Federal de Alagoas, pelo uso dos laboratórios e apoio científico. À Fundação de Apoio à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL), por financiar o projeto.

Referências

Abebe T, Melmaiee K, Berg V, Wise RP (2009) Drought response in the spikes of barley: gene expression in the lemma, palea, awn, and seed. *Functional & Integrative Genomics* 10: 191-205.

Alcázar R, Marco F, Cuervas JC, Patron M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio AF, Altabella T (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters* 28: 1867-1876.

Azarkan M, Wintjens R, Looze Y, Baeyens-Volant D (2004) Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. *Phytochemistry* 65(5): 525-534.

Baker NR (2008) Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *in vivo*. *Annual Review of Plant Biology*. 59:89-113.

Biernet GP, Schjoerring JK, Jahn TP (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1758(8): 994-1003.

Borges JC, Peroto MC, Ramos CHI (2001) Molecular chaperone genes in the sugarcane expressed sequence database (SUCEST). *Genetics and Molecular Biology* 24(1-4): 85-92.

Bruce WB, Edmeades GO, Barker TC (2002) Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53(366): 13-25.

Cagliari TC, Tiroli AO, Borges JC, Ramos CHI (2005) Identification and *in silico* expression pattern analysis of *Eucalyptus* expressed sequencing tags (ESTs) encoding molecular chaperones. *Genetics and Molecular Biology* 28(3): 520-528.

Cameron KD, Teece MA, Smart LB (2006) Increased Accumulation of Cuticular Wax and Expression of Lipid Transfer Protein in Response to Periodic Drying Events in Leaves of Tree Tobacco. *Plant Physiology* 140: 176-183.

Capell T, Bassie L (2005) Progress in the Modulation of the Polyamine Biosynthetic Pathway in Transgenic Rice. *Journal of Biological Sciences* 5(3): 379-390.

Capell T, Bassie L, Christou P (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *PNAS* 101(26): 9909-9914.

Carson DL, Botha FC (2002) Genes expressed in sugarcane maturing internodal tissue. *Plant Cell Reports* 20:1075-1081.

Casu RE, Manners JM, Bonnet GD, Jackson PA, McIntyre CL, Dunne R, Chapman SC, Rae AL, Grof CPL (2005) Genomics approaches for the identification of genes determining important traits in sugarcane. *Field Crops Research* 92: 137-147.

Cheong YH, Chang H-SC, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S (2002) Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 661-677.

Chinnusamy V, Gong Z, Zhu J-K (2008) Abscisic Acid-mediated Epigenetic Processes in Plant Development and Stress Responses. *Journal of Integrative Plant Biology* 50(10): 1187-1195.

Chinnusamy V, Zhu J-K (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 1-7.

Christopher ME, Miranda M, Major IT, Constabel CP (2004) Gene expression profiling of systemically wound-induced defenses in hybrid poplar. *Planta* 219: 936-947.

Danielson JAH, Johanson U (2008) Unexpected complexity of the Aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens* *BMC Plant Biology* 8: 45.

Felix JM (200?) Análise do transcriptoma da cana-de-açúcar e sua contribuição para o acúmulo de sacarose. Centro de Tecnologia Canavieira – CTC – Piracicaba SP.

Fumis TF, Pedras JF (2002) Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37(4): 449-453.

Garcia BA, Hake SB, Diaz RL et al (2007) Organismal Differences in Post-translational Modifications in Histones H3 and H4. *The Journal of Biological Chemistry* 282(10): 7641-7655.

Ge C, Cui X, Wang Y, Hu Y, Fu Z, Zhang D, Cheng Z, Li J (2006) BUD2, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for *Arabidopsis* growth and development. *Cell Research* 16: 446-456.

Ghannoum O (2009) C4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany* 103: 635-644.

Gonçalves ER, Ferreira VM, Silva JV, Endres L, Barbosa TP, Duarte WG (2010) Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 14(4): 378-386.

Grivet L, Arruda P (2001) Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Plant Biology* 5:122-127.

Groppa MD, Benavides, MP (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34: 35-45.

Grzesiak MT, Rzepka A, Hura T, Grzesiak S, Hura K, Filek W, Skoczowski A (2007) Fluorescence excitation spectra of drought resistant and sensitive genotypes of triticale and maize. *Photosynthetica* 45(4): 606-611.

Guo P, Baum M, Grando S et al (2009) Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany* 60(12): 3531-3544.

Hachez C, Heinen RB, Draye X, Chaumont F (2008) The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. *Plant Molecular Biology* 68: 337-353.

Haldrup A, Lunde C, Scheller HV (2003) *Arabidopsis thaliana* Plants Lacking the PSI-D Subunit of Photosystem I Suffer Severe Photoinhibition, Have Unstable Photosystem I Complexes, and Altered Redox Homeostasis in the Chloroplast Stroma. *The Journal of Biological Chemistry* 278(35): 33276-33283.

Heinen RB, Ye Q, Chaumont F (2009) Role of aquaporins in leaf physiology. *Journal of Experimental Botany* 60(11): 2971-2985.

Hoarau J-Y, Grivet L, Offmann B, Raboin L-M, Diorflar J-P, Payet J, Hellmann M, D'Hont A, Glaszmann J-Ch (2002) Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). II. Detection of QTLs for yield components. *Theoretical Applied Genetics* 105:1027-1037.

Hoarau J-Y, Offmann B, D'Hont A, Risterucci A-M, Roques D, Glaszmann J-Ch, Grivet L (2001) Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP markers. *Theoretical Applied Genetics* 103:84-97.

Ihnatowicz A, Pesaresi P, Varotto C, Richly E, Schneider A, Jahns P, Salamini F, Leister D (2004) Mutants for photosystem I subunit D of *Arabidopsis thaliana*: effects on photosynthesis, photosystem I stability and expression of nuclear genes for chloroplast functions. *The Plant Journal* 37: 839-852.

Jang CS, Lee HJ, Chang SJ, Weon Y (2004) Expression and promoter analysis of the *TaLTP1* gene induced by drought and salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* 167(5): 995-1001.

Kim J-M, To TK, Nishioka T, Seki M (2010) Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. *Plant, Cell & Environment* 33: 604-611.

Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158.

Maurel C (2007) Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Letters* 581(12): 2227-2236.

Melo AS, Suassuna JF, Fernandes PD, Brito MEB, Suassuna AF, Aguiar Neto AO (2010) Crescimento vegetativo, resistência estomática, eficiência fotossintética e rendimento do fruto da melancia em diferentes níveis de água. *Acta Scientiarum. Agronomy* 32(1):73-79.

Molinari HBC (2006) Expressão estresse-induzida do gene *P5CS* em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico. Tese, Universidade Federal do Paraná

Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2002) PGR5 Is Involved in Cyclic Electron Flow around Photosystem I and Is Essential for Photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* 110(3): 361-371.

Munekage Y, Shikanai T (2005) Cyclic electron transport through photosystem I. *Plant Biotechnology* 22: 361-389.

Peremart A, Bassie L, Christou P, Capell T (2009) Spermine facilitates recovery from drought but does not confer drought tolerance in transgenic rice plants expressing *Datura stramonium* S-adenosylmethionine decarboxylase. *Plant Molecular Biology* 70:253-254.

Rodrigues FA, Laia ML, Zingaretti SM (2009) Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. *Plant Science* 176: 286-302.

Rodríguez-Pérez L (2006) Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas. *Agronomía Colombiana* 24(1): 1-14.

Sakurai J, Ahamed A, Murai M, Maeshima M, Uemura M (2008) Tissue and Cell-Specific Localization of Rice Aquaporins and Their Water Transport Activities. *Plant Cell Physiol.* 49(1): 30-39.

Shikanai T (2007) Cyclic Electron Transport Around Photosystem I: Genetic Approaches. *Annual Review Plant Biology* 58: 199-217.

Silva MA, Jifon J, Da Silva JAG, Sharma V (2007) Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian Journal Plant Physiology* 19(3): 193-201.

Silva MA, Silva JAG, Enciso J, Sharma V, Jifon J (2008) Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. *Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.)* 65(6): 620-627.

Sperry JS (2000) Hydraulic constraints on plant gas exchange. *Agricultural and Forest Meteorology* 104: 13-23.

Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.

Takabatake R, Seo S, Ito N, Gotoh Y, Mitsuhara I, Ohashi Y (2006) Involvement of wound-induced receptor-like protein kinase in wound signal transduction in tobacco plants. *The Plant Journal* 47: 249-257.

Tomkris JP, Yu Y, Miller-Smith H, Frisch DA, Woo SS, Wing RA (1999) A bacterial artificial chromosome library for sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics* 99:419-424.

Varoto C, Pesaresi P, Jahns P, Leßnick A, Tizzano M, Schiavon F, Salamini F, Leister D (2002) Single and Double Knockouts of the Genes for Photosystem I Subunits G, K, and H of *Arabidopsis*. Effects on Photosystem I Composition, Photosynthetic Electron Flow, and State Transitions. *Plant Physiology* 129: 616-624.

Vettore AL, Silva FR, Kemper EL, Arruda P (2001) The libraries that made SUCEST. *Genetics and Molecular Biology* 24(1-4): 1-7.

Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9: 244-252.

Wierzbicki AT, Jerzmanowski A (2005) Suppression of Histone H1 Genes in *Arabidopsis* Results in Heritable Developmental Defects and Stochastic Changes in DNA Methylation. *Genetics* 169: 997-1008.

Xiong L, Schumaker KS, Zhu J-K (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell* S165-S183.

Yeats TH, Rose JKC (2007) The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science* 17: 191-198.

Yordanov I, Velikova V, Tsonev T (2000) Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica* 38(1): 171-186.

Yordanov I, Velikova V, Tsonev T (2003) Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulgarian Journal Plant Physiology Special Issue* 187-206.

Zamperlini GP, Cunha JT, Ventura JA, Silva DM (2008) Estudo da eficiência fotossintética em três cultivares de abacaxizeiro (*Ananas comocus* L. Merrill). 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture Vitória-ES Brazil.

Zolla L, Rinalducci S, Timperio AM (2007) Proteomic analysis of photosystem I components from different plant species. *Proteomics* 7: 1866-1876.

4. CONCLUSÕES

O déficit hídrico severo implantado no experimento foi suficiente para provocar uma expressão gênica diferencial em amostras de tecido foliar do genótipo RB72910.

As análises comparativas de fisiologia vegetal nas duas condições estudadas permitiram concluir que a variedade RB72910 diminuiu suas propriedades de eficiência fotossintética (F_v/F_m), condutância estomática (A), taxas fotossintética (E) e de transpiração (g_s) sob estresse hídrico severo, porém a redução foi menor que as apresentadas pela variedade RB72454, sensível à seca.

A análise da expressão gênica diferencial dos onze genes analisados no acesso RB72910 foi eficaz na identificação de duas características agronômicas importantes para os programas de melhoramento de cana-de-açúcar: resistência à fotoinibição sob alta luminosidade e boa adaptação metabólica sob estresse hídrico severo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação descreve o primeiro trabalho de expressão gênica diferencial em vegetal, por *real-time* RT-PCR, inteiramente realizado pelo Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração de Produção Vegetal e Proteção de Plantas, Laboratório de Recursos Genéticos – UFAL/Arapiraca. Por ser um trabalho pioneiro, reconhecemos suas limitações e ao mesmo tempo ficamos exultados com o sucesso obtido.

As pesquisas realizadas no Programa de Melhoramento da Cana-de-açúcar (PMGCA) no Estado de Alagoas e da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA) são reconhecidas mundialmente, assim como as variedades República do Brasil (RB). O êxito deste nosso experimento abre novas e boas perspectivas para a comunidade científica alagoana que visa a obtenção de variedades com características agrônômicas e comerciais relevantes, devido ao potencial existente no banco de dados SUCEST e no banco de germoplasma localizado na Serra do Ouro, no município de Murici – AL, disponíveis à pesquisa local.

A análise de expressão gênica por *real-time* PCR é uma ferramenta indiscutivelmente eficaz na obtenção de informações importantes no melhoramento de plantas cultiváveis, principalmente pela sua especificidade e velocidade de resposta, o que contribui para o melhoramento tradicional no tocante à economia de tempo e recursos financeiros. O domínio desta técnica poderá proporcionar um enriquecimento científico considerável nos próximos trabalhos envolvendo genética vegetal no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

Os resultados permitiram identificar genes e processos fisiológicos associados ao estresse hídrico em um importante genitor no Programa de Melhoramento de Cana-de-Açúcar, permitindo planejar cruzamentos e assim contribuir para o desenvolvimento de novas variedades mais eficientes no uso de água.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDAR, A. Perspectiva e análise do “supply x demand” do álcool hidratado para 2020. **Fórum Internacional Ethanol Trade Association – IETHA**, 2010. Disponível em < <http://www.ietha.org/site/pics/12345678987601.pdf> >. Acesso em: 09 set. 2010, 17:59:06.

ANSELMINI, R. Setor representa 3,65% do PIB e gera 4 milhões de empregos. **JornalCana.com.br**, 2006. Disponível em < http://www.jornalcana.com.br/conteudo/noticia.asp?id_materia=24684 >. Acesso em: 17 abr. 2010, 15:27:32.

ARAYA, M. K.; BARNES, D. F.; CONSTANT, S. M. Potencial for biofuels for transport in developing countries. **Esmap Knowledge Exchange**, n. 4, 2006.

AUSTRALIAN GOVERNMENT. Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator. **The biology and ecology of sugarcane (*Saccharum spp. Hybrids*) in Australia**. 2004.

BACCI Jr, M. et al. A search for markers of sugarcane evolution. **Genetics and Molecular Biology**, n. 24, p. 169-174, 2001.

BARGMANN, B. O.; MUNNIK, T. The role of phospholipase D in plant stress responses. **ScienceDirect**, n. 9, p. 515-522, 2006.

BONILHA, R. P. **Queima da palha da cana-de-açúcar: questões jurídicas e sócio-econômicas**. 2007. 76 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Direito de Presidente Prudente, Faculdades Integradas “Antônio Eufrásio de Toledo”, São Paulo, 2007.

BOWER, N. I. et al. Universal reference method for real-time PCR gene expression analysis of preimplantation embryos. **BioTechniques**, n. 42, p. 199-206, 2007.

BRANCO, D. S. **Sinalização por carboidratos em cana-de-açúcar e divergência evolutiva**. 2008. 203 f. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Balanco nacional da cana-de-açúcar e agroenergia**, DF, 2007, 140 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **História da cana-de-açúcar**. Brasília, DF, [2003?], 3 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Produtividade da cana-de-açúcar**. Brasília, DF, [200?], 1 p.

BRASILEIRO, A. C. M.; SANTOS, C. M. R.; MORGANTE, C. V. Análise *in silico* da expressão gênica diferencial de plantas de *Arachis magna* submetidas a estresse hídrico.

Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 229, 2008.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, n. 25, p. 169-193, 2000.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, n. 29, p. 23-39, 2002.

CARRER, H. Micropropagação e transformação genética. **Revista Opiniões**. 2008. Disponível em: <<http://www.revistaopinioes.com.br/aa/materia.php?id=476>>. Acesso em: 02 mar 2010, 16:53:32.

CARSON, D. L.; BOTHA, F. C. Preliminary analysis of expressed sequence tags or sugarcane. **Crop Science**., n. 40, p. 1769-1779, 2000.

CARVALHO, M. H. C. Drought stress and reactive oxygen species. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 3, p. 156-165, 2008.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, n. 30, p. 239-264, 2003.

CHRISTMANN, A. et al. A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. **The Plant Journal**, n. 52, p. 167-174, 2007.

COLARES, D. G. Variedade de cana-de-açúcar tolerante à seca em desenvolvimento na Embrapa. Agroenergia: foco em soluções – da biomassa à energia. **Embrapa agroenergia**. 2009. Disponível em: <<http://www.cnpae.embrapa.br/pasta-NoTiciasUd/pasTanoticiasud.2009-05-04.5830154749/noticiasud.2009-05-29.2306302644>>. Acesso em 02 mar 2010, 14:43:11.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**. Primeiro Levantamento, 2010/2011, 12p.

CTC. Centro de Tecnologia Canavieira e BASF firmam acordo de cooperação técnica em cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo>>.

FELIX, J. M. **Análise de expressão gênica envolvida no metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2006. 162 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

FERRE, F. Quantitative ou semi-quantitative PCR: reality versus myth. **Genome Research**, n. 2, DOI 10.1101/gr.2.1.1, 1992.

GHANNOUM, O. C₄ photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, n. 103, p. 635-644, DOI 10.1093/aob/mcn093, 2009.

GRIVET, L. et al. ESTs as a source for sequence polymorphism discovery in sugarcane: example of the *Adh* genes. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 106, p. 190-197, DOI 10.1007/s00122-002-1075-1, 2003.

GRIVET, L. et al. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research & Applications**, n. 2, p. 9-17, 2004.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, n. 6, p. 986-994, DOI 10.1101/gr.6.10.986, 1996.

HUANG B, XU C. Identification and Characterization of Proteins Associated with Plant Tolerance to Heat Stress. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 10, p. 1230-1237, 2008.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, 2005.

HUSSAIN, A. et al. Sugarcane, sugar metabolism and some abiotic stress. **Internacional Journal of Agriculture & Biology**, v. 6, n. 4, p. 732-742, 2004.

INGELBRECHT, I. L.; IRVINE, J. E.; MIRKOV, T. E. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiology**, 119, p. 1187-1197, 1999.

INMAN-BAMBER, N. G. Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. **Science Direct**, 2004. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/scienceob+Mimg&_imagekey=B6T6M-4C40V5T-1-1S&_C DI=5034&_user=686332&_pii=S0378429004000589&_orig=search&_coverDate=09%2F2004&_sk=9991099998&view=c&wchp=dGLzVlb-zSkzS&md5=75d05a259bd0a4c42f1c7b8849975d8f&ie=sdarticle.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2010, 09:23:17.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, n. 92, p. 185-202, 2005.

ISKANDAR, H. M.; SIMPSON, R. S. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, n. 22, p. 325-337, 2004.

JANGPROMMA, N. et al. A proteomics analysis of drought stress-responsive proteins as biomarker for drought-tolerant sugarcane cultivars. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 89-210, 2010.

JANNOO, N. et al. Evaluation of the genetic base of sugarcane cultivars and structuration of the diversity at the chromosome level using molecular markers. **Food and Agricultural Research Council**, p. 123-135, 1999.

LIBEREK, K; LEWANDOWSKA, A; ZIETKIEWICZ, S. Chaperones in control of protein disaggregation. **The EMBO journal**, v. 27, p. 328-335.

LISSON, S. N. et al. The historical and future contribution of crop physiology and modelling research to sugarcane production systems. **Field Crops Research**, n. 92, p. 321-335, 2005.

MA, H.-M. et al. An EST survey of the sugarcane transcriptome. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 108, p. 851-863, DOI 10.1007/s00122-003-1510-y, 2004.

MARIN, F. R. et al. Sugarcane crop efficiency in two growing seasons in São Paulo State, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 11, p. 1449-1455, 2008.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

McQUALTER, R. B. et al. Initial evaluation of sugarcane as a production platform for p-hydroxybenzoic acid. **Plant Biotechnology Journal**, n. 3, p. 29-41, 2005.

MENOSSE, M. et al. Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2008, DOI 10.1155/2008/458732, 2008.

NELL, H. **Genetic manipulation of sucrose-storing tissue to produce alternative products**. 2007. 98 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Plantas) – Universidade de Stellenbosch, África do Sul, 2007.

NOGUEIRA, F. T. S. et al. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1811-1824, 2003.

NOGUEIRA, F. T. S. **Identificação e caracterização de genes expressos em resposta ao estresse por baixa temperatura em cana-de-açúcar**. 2004. 140 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

OLIVEIRA, K. M. **Desenvolvimento de marcadores moleculares EST-SSRs e mapeamento funcional em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2006. 165 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

PAIVA, L. Alerta Laranja. Espaço Fitotécnico. **Revista Canamix**, p. 26-29, 2010.

PAPINI-TERZI, F. S. Sugarcane genes associated with sucrose content. **BMC Genomics**, n. 10, DOI 10.1186/1471-2164-10-120, 2009.

PASSIORA, J. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-5, DOI 10.1093/jxb/erl212, 2006.

PESSOA-Jr, A. et al. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 59-70, 2005.

PFAFFL, M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, 2000.

Php?id=31343>. Acesso em: 02 mar 2010, 10:03:57.

QUACKENBUSH, J. F.; BERNARD, P. S. Statistical modeling for selecting housekeeper genes. **Gene Biology**, v. 5, n. 59, 2004.

RADONIC, A. et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 313, p. 856-862, 2004.

RIERA, M. et al. The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signalling components. **Physiologia Plantarum**, n. 123, p. 111-119, DOI 10.1111/j.1399-3054.2005.00469.x, 2005.

ROCHE APPLIED SCIENCE, **Technical Note**, n. LC 13, 2001.

ROCHE APPLIED SCIENCE, **Technical Note**, n. LC 15, 2002.

RODRIGUES, F. B.; LAIA, M. L.; ZINGARETTI, S. M. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. **Plant Science**, n. 176, p. 286-302, 2009.

ROSSI, M. et al. Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics**, v 269, p. 406-419, DOI 10.1007/s00438-003-0849-8, 2003.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998.

SCHULZE, E. -D; BECK, E.; MÜLLER-HOHESTEIN, K. Environment as stress factor: stress physiology of plants. **Plant Ecology**, v. IX, n. 702, ISBN: 978-3-540-20833-4, 2005.

SELVI, A. et al. Genomic constitution and genetic relationship among the tropical and subtropical indian sugarcane cultivars revealed by AFLP. **Genomics, Molecular Genetics & Biotechnology**, n. 45, p. 1750-1757, 2005.

SHINOZAKI, K. YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 221-227, 2007.

SILVA, M. A. et al. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal Plant Physiology**, n. 19, p. 193-201, 2007.

SILVA, M. A. et al. Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. **Scientia Agricola**. (Piracicaba, Braz.), v. 65, n. 6, p. 620-627, 2008.

SINGH, K. B.; RHONDA, C. F.; OÑATE-SÁNCHEZ, L. Transcription factor in plant defense and stress responses, **Plant Biology**, n. 5, p. 430-436, DOI 10.1016/S1369-5266(02)00289-3, 2002.

SREEDHAR, A. S., VANATHI, P., PAITHANKAR, K.R. Stress proteins in biology and medicine: evolution, adaptation and clinical evaluation. **Internacional Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1, n. 3, p. 1-36, 2010.

THELLIN, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, n. 75, p. 291-295, 1999.

TORQUATO, S. A. Cana-de-açúcar para indústria: o quanto vai precisar crescer. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v. 1, n. 10, ISSN 1980-0711, 2006.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances Physiology Education**, n. 29, p. 151-159, DOI 10.1152/ascN.00019.2005, 2005.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 2002.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, n. 39, p. 75-85, 2005.

YANG, M. et al. Genomics, molecular genetics & biotechnology. **Crop Science Society of America**, n. 43, p. 1805-1813, 2003.

ZHICHANG, Z. et al. Over-expression of *Arabidopsis* DnaJ (*HSP40*) contributes to NaCl-stress tolerance. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 7, p. 972-978, 2010.

ZHU, J. –K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review Plant Biology**, n. 53, p. 247-273, DOI 10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329, 2002.