

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DENNIS CRYSTIAN SILVA

**GENES DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE ESTRESSE HÍDRICO
EM CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO RT-PCR**

Rio Largo/AL
2014

DENNIS CRYSTIAN SILVA

**GENES DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE ESTRESSE HÍDRICO
EM CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO RT-PCR**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Agronomia: Produção Vegetal, da Universidade Federal de Alagoas – Centro de Ciências Agrárias, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida.

Rio Largo/AL
2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S586g

Silva, Dennis Crystian.

Genes de referência para estudos de estresse hídrico em cana-de-açúcar utilizando RT-PCR / Dennis Crystian Silva. - 2014.

50 f. : il. tabs., grafs.

Orientador: Cícero Carlos de Souza Almeida.

Dissertação (mestrado em Agronomia : Produção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2014.

Bibliografia: f. 40-50.

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

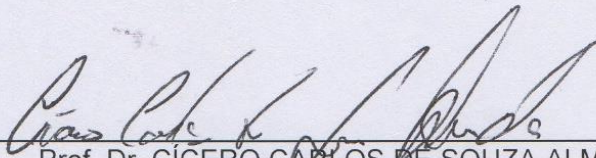
TERMO DE APROVAÇÃO

DENNIS CRYSTIAN SILVA

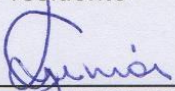
(Matrícula 12130106)

**GENES DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE ESTRESSE HÍDRICO EM CANA-DE-
AÇÚCAR UTILIZANDO RT-PCR**

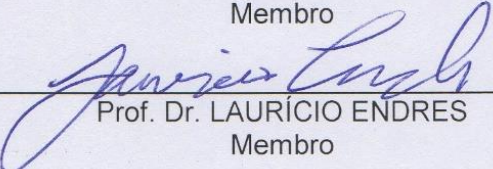
Dissertação apresentada e avaliada pela banca examinadora em trinta de maio de 2014, como parte dos requisitos para obtenção de Mestre em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal do Programa de Pós-Graduação em Agronomia "Produção Vegetal" da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias da UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS.



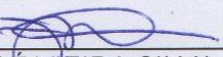
Prof. Dr. CÍCERO CARLOS DE SOUZA ALMEIDA
Presidente



Prof. Dr. GILDEMBERG AMORIM LEAL JUNIOR
Membro



Prof. Dr. LAURÍCIO ENDRES
Membro



Prof. Dr. JOSÉ VIEIRA SILVA
Membro

RIO LARGO – AL
Maio/2014

Aos meus pais Carlos Francisco da Silva e Marta Liane Dionísio da Silva, pelo exemplo de vida, carinho e apoio eterno, pelo esforço e incentivo desde o início de minha formação e por acreditarem sempre em meus objetivos. Aos meus irmãos Danielle Crystine Silva e Danillo Carlos Dionísio Silva, pelos momentos únicos de alegria. As minhas avós Madalena Dionísio e Lucia Florentino “in memória” por estarem presentes em minha educação e formação como pessoa, desejando sempre a conquista de meus ideais.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, conquistas realizadas, coragem e persistência para conquistar meus ideais em meio às dificuldades e por estar junto a mim neste caminho que sigo.

Ao meu orientador, Cícero Carlos de Souza Almeida, pela confiança na responsabilidade deste trabalho, contribuindo como referência para a minha formação profissional e acadêmica.

Aos colegas Aline Bezerra, Beatriz Caetano, Bruna Mariza, Daniel Oliveira, Eliane Paz, Jackeline Terto, Jéssica Naiana, Jurema de Queiros, Karla Emanuella, Suzanne Nunes e Vanessa Emanuelle do Laboratório de Recursos Genético da Universidade Federal de Alagoas, *Campus Arapiraca*, em especial a Marislane Carvalho pela amizade, companheirismo, auxílio mutuo, sem o qual este trabalho não seria desenvolvido da mesma forma.

Aos colegas Robson de Lira e Hugo Marques do laboratório de fisiologia vegetal da Universidade Federal de Alagoas, *Campus Arapiraca*.

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

A todos que direta ou indiretamente contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Ao BNB pelo suporte financeiro através do projeto “Fisiologia e Genética da cana-de-açúcar para tolerância à seca”.

“Desde a idade de seis anos eu tinha mania de desenhar a forma dos objetos. Por volta dos cinquenta havia publicado uma infinidade de desenhos, mas tudo o que produzi antes dos sessenta não deve ser levado em conta. Aos setenta e três compreendi mais ou menos a natureza, as plantas, as árvores, os pássaros, os peixes e os insetos. Em consequência, aos oitenta terei feito ainda mais progresso. Aos noventa penetrarei no mistério das coisas; aos cem, terei decididamente chegado a um grau de maravilhamento – e quando eu tiver cento e dez anos, para mim, seja um ponto ou uma linha, tudo será vivo. ”

(Katsuhica Hokusai)

RESUMO

Em estudos de expressão genica, os genes de referência possuem elevada importância para análises de expressão genica quantitativa, tendo em vista a necessidade de normalizadores endógenos relacionados a alteração da expressão genica. Objetivando analisar genes de referência associados com estresse hídrico em genótipos de cana-de-açúcar, selecionou-se as variedades RB72910 e RB72454, identificadas pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar com a maior e menor tolerância ao déficit hídrico, respectivamente. Os genótipos foram submetidos a estresse hídrico e a capacidade de campo. Quanto a fisiologia, foi realizada a análise da taxa fotossintética, da transpiração e da condutância estomática. Observou-se, para as variáveis fisiológicas, que existe diferença significativa apenas entre os tratamentos, enquanto os genótipos não diferiram estatisticamente. A análise de variância e os *softwares* *geNorme*, *NormFinder* e *BestKeeper* foram utilizados para analisar a expressão gênica, obtida por meio de RT-PCR, em oito genes de referência, estes são: α -Tubulina, β -Tubulina, β -Actina, Ciclofilina, Alongamento, GAPDH, Histona e Ubiquitina. Desta forma, existiu diferença significativa relacionada à expressão gênica entre os tratamentos, os genes e os genótipos. Dentre os genes candidatos, o GAPDH foi identificado com a maior estabilidade pelos *softwares* já mencionados. Estes resultados indicam que apesar dos genótipos apresentarem comportamento fisiológico semelhante, os genes de referência testados possuíram expressão gênica diferencial, característica que qualifica os genes de referência mais estáveis dentre todos os genes testados. Com isso, concluímos que, quando utilizado sem parceria, o GAPDH é o gene de referência mais adequado para estudos relacionados ao estresse hídrico em cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Saccharum*, expressão gênica, *real-time* PCR, *housekeeping*.

ABSTRACT

In gene expression studies, the reference genes are highly important for quantitative gene expression analysis in view of the need of endogenous standard-setting related to changes in gene expression. Aimed at analyzing reference genes associated with drought stress in genotypes of cane sugar, we selected the RB72910 and RB72454 varieties, identified by the Program for Genetic Improvement of Sugarcane with the highest and lowest tolerance to water deficit, respectively. The genotypes were subjected to drought and field capacity. Regarding the physiology, analysis of photosynthetic rate, transpiration rate and stomatal conductance was performed. Observed for the physiological variables, there is a significant difference only between treatments, while the genotypes did not differ statistically. The analysis of variance and geNorme, NormFinder and BestKeeper softwares were used to analyze gene expression, obtained by RT-PCR in eight reference genes, these are: α -Tubulin, β -Tubulin, β -Actin, Cyclophilin, Elogation, GAPDH, Histone and Ubiquitin. Thus, there was significant difference in gene expression between treatments, genes and genotypes. Among the candidate gene, GAPDH was identified with greater stability by software already mentioned. These results indicate that although the genotype exhibited similar physiological behavior, genes reference to tested possessed differential gene expression characteristic that describes the most stable reference genes among all tested genes. Thus, we conclude that, when used without partnership, GAPDH is best suited for projects related to water stress in sugar cane studies reference gene.

Keywords: Saccharum, gene expression, real-time PCR, housekeeping.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

- Figura 1. Área de Cultivo e centro de origem da cana-de-açúcar. Em verde destacam-se as principais regiões produtoras de cana-de-açúcar. A região em azul destaca o sudoeste Asiático como provável centro de origem das espécies do gênero *Saccharum*. Fonte: CIB (Conselho de Informações sobre Biotecnologia) 14
- Figura 2. Origem dos cultivares atuais de cana-de-açúcar. Este esquema mostra os cruzamentos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* até a formação dos híbridos atuais 17
- Figura 3. Eletroforese em gel com concentração de 1% de agarose. Em A, pode-se visualizar a qualidade da extração de RNA, enquanto em B, verificou-se a qualidade da síntese de cDNA 30
- Figura 4. Representação gráfica das variedades RB72454 e RB72910 relacionadas à taxa fotossintética (A), transpiração foliar (E) e condutância estomática (g_s) sob condições de capacidade de campo (CC) e estresse hídrico (SS) 34
- Figura 5. Expressão diferencial de oito genes de referência em dois tratamentos: CC (Capacidade de Campo) e SS (Estresse hídrico)..... 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de <i>primers</i> de genes usados em real time PCR.....	31
Tabela 2. Análise de variância para os fatores fisiológicos sob estresse hídrico e controle: A (taxa fotossintética); E (transpiração); g_s (condutância estomática)	33
Tabela 3. Análise de variância para o limiar da fase exponencial: C_t (<i>Cycle Threshold</i>)	35
Tabela 4. Classificação dos genes de referência quanto ao potencial de estabilidade de acordo com a metodologia de avaliação	39

LISTA DE ABREVIATURAS: SIGLAS, SÍMBOLOS E ACRÔNIMO

°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
µmol	Micromol
A	Taxa fotossintética ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
ABA	Ácido Abscísico
CIB	Conselho de Informações sobre Biotecnologia
CO ₂	Gás Carbônico
C _t	Cycle Threshold
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
DNA	Deoxyribonucleic Acid
E	Transpiração Foliar ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
g _s	Condutância estomática
HiCEP	High Coverage Gene Expression Profiling
IAC	Instituto Agrônomo de Campinas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IRGA	Infrared Gas Analyser
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mmol	Milimol
mol	$6,02 \times 10^{23}$ moléculas
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nM	Nanomolar
PCR	Polimerase Chain Reaction
PMGCA	Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RB	República do Brasil
RIDESA	Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
Seq	Sequenciamento
SP	São Paulo
SSH	Subtractive Suppression Hybridization
U	Unidade(s) de enzima(s)
UNICA	União da Indústria de Cana-de-Açúcar

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1.	CANA-DE-AÇÚCAR	14
2.1.1.	CENTRO DE ORIGEM	14
2.1.2.	TAXONOMIA	14
2.1.3.	BOTÂNICA	15
2.2.	MELHORAMENTO GENÉTICO	16
2.3.	O CULTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR	19
2.4.	ASPECTOS ECONÔMICOS	19
2.5.	CONDIÇÕES HÍDRICAS PARA CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR	22
2.6.	EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL	23
2.6.1.	GENES DE REFERÊNCIA POR MEIO DE RT-PCR	24
3.	OBJETIVO GERAL	28
3.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4.	MATERIAL E MÉTODOS	29
5.	RESULTADO E DISCUSSÃO	32
6.	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXO	48

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar se destaca pela alta produção, no entanto, a pouca disponibilidade de água promove uma diminuição acentuada na produção canavieira. Essa condição tem exigido, aos programas de melhoramento, o desenvolvimento de novas variedades com maior tolerância ao déficit hídrico.

Estudos quanto à tolerância ao estresse hídrico são considerados complexos, devido à dificuldade em estimar fatores fisiológicos e a relação que pode existir entre a tolerância e os fatores genéticos que a controla. Alguns estudos relacionados a biblioteca subtrativa e sequenciamento de alta performance são capazes de identificar fatores genético de grande expressão e tornam-se ferramentas fundamentais nas pesquisas gênicas. Os genes, pertencentes a diferentes classes de fatores de transcrição e família de proteínas, associadas com estresse hídrico têm sido uma alternativa promissora para estudar variedades mais tolerantes a pouca disponibilidade hídrica. Estudos relacionados a identificação e manipulação desses genes estão cada vez mais constantes, possibilitando o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados. O isolamento dos genes é um procedimento complexo, entretanto, a viabilidade funcional destes genes é confirmada a partir de análises da expressão gênica sob as condições abióticas de estresse. Análise esta, possível a partir da utilização de um referencial endógeno ao organismo estudado, servindo como um controle positivo aos níveis de expressão.

Considerados como genes de referência, os *housekeepings* são genes de manutenção celular capazes de codificar proteínas vitais, sob níveis similares de expressão gênica em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento. Normalmente, um gene de referência é caracterizado por ser expresso de forma estável entre as diferentes amostras experimentais.

Desta forma, estudar genes de referência correlacionados a expressão gênica sob estresse hídrico é de suma importância para identificar genes relacionados à tolerância à seca em cana-de-açúcar e conseqüentemente obtenção de organismos transformados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CANA-DE-AÇÚCAR

2.1.1. CENTRO DE ORIGEM

Apesar da divergência de informações quanto ao local de origem do gênero *Saccharum*, regiões como a Índia, China, Nova Guiné e Indonésia são definidas como possíveis locais de origem da cana-de-açúcar. No entanto, a região sudoeste Asiática é comumente definida como centro de origem destas espécies (Figura 1) (MUKHERJEE, 1957; DANIELS e ROACH, 1987).

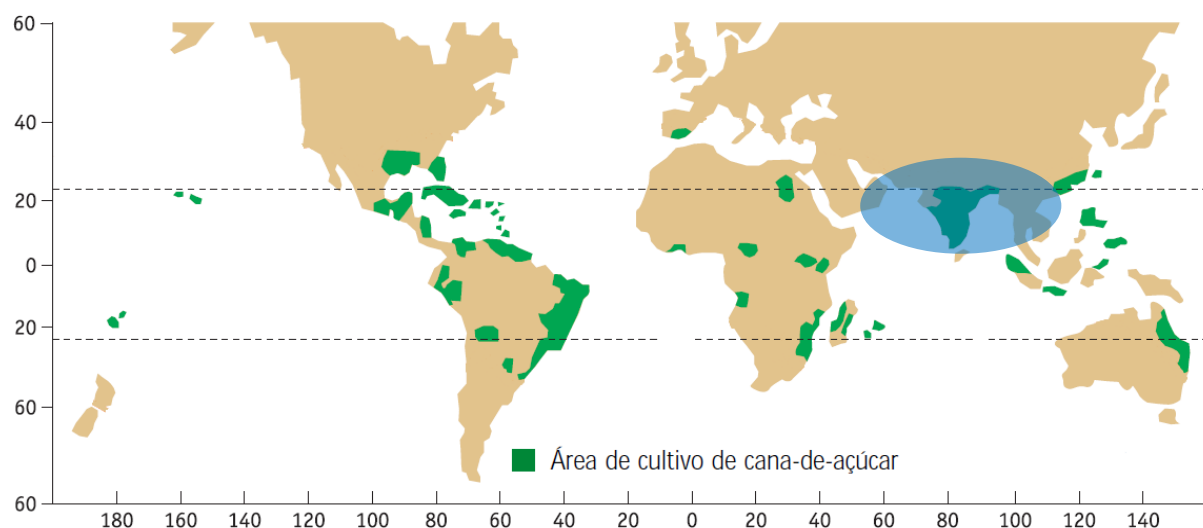


Figura 1 – Área de Cultivo e centro de origem da cana-de-açúcar. Em verde destacam-se as principais regiões produtoras de cana-de-açúcar. A região em azul destaca o sudoeste Asiático como provável centro de origem das espécies do gênero *Saccharum*. Fonte: CIB (Conselho de Informações sobre Biotecnologia).

2.1.2. TAXONOMIA

A cana-de-açúcar pertencente ao gênero *Saccharum*, taxonomicamente descrita por Linnaeus em 1753. Bacchi (1983) caracterizou a cana-de-açúcar como pertencente à Subtribo *Saccharae*, Tribo *Andropogone*, Família *Poaceae*, Ordem *Glumiflorae*, Classe *Monocotyledoneae*, Sub Divisão *Angiospermae* e Divisão

Embryophyta siphonogama. Durante os séculos XIX e início do século XX diversos estudos foram responsáveis por distinguir indivíduos pertencentes ao gênero *Saccharum*, porém, em revisões sobre a classificação botânica da cana-de-açúcar, Dutt e Rao, em 1950, sugeriram a estruturação do gênero *Saccharum* em seis espécies: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. edule* e *S. robustum* (GRASSL, 1964). Estas espécies são definidas como selvagens, tornando-se precursoras para a origem dos cultivares modernos (GRIVET, 2004), e geneticamente caracterizadas pela presença de espécies poliplóides e aneuplóides (GRIVET E ARRUDA, 2002),

Os atuais cultivares de cana-de-açúcar são derivados de cruzamentos interespecíficos entre a espécie nobre *Saccharum officinarum* ($x = 10$, $2n = 8x = 80$) e a espécie selvagem *Saccharum spontaneum* ($x = 8$, $2n = 5-16x = 40-128$), contendo entre 100 e 130 cromossomas com 70-80% de *S. Officinarum*, 10-20% de *S. spontaneum* e 10% de recombinantes entre os dois genomas (D' HONT *et al.*, 1996). Como resultado, possuem elevados níveis de sacarose, vigor vegetativo e resistência a doenças (IRVINE, 1999).

2.1.3. BOTÂNICA

Segundo Scarpari e Beauclair (2008), a botânica e anatomia da cana-de-açúcar foi inicialmente descrita por Van Dillewijn em 1952, durante as pesquisas de taxonomia da espécie.

As espécies do gênero *Saccharum* possuem elevado porte, podem formar touceiras, em condições naturais são perenes, e semiperenes quando cultivadas. A parte aérea da planta é constituída de colmo, folhas e inflorescência, enquanto a parte subterrânea é formada por raiz e rizoma.

O colmo é a principal parte vegetal utilizada na produção sucroalcooleira, devido ao elevado potencial sacarídeo presente no mesmo. Morfologicamente cilíndrico, o colmo é constituído por vários entrenós dispostos sucessivamente e distintos por nós, nestes é possível encontrar gemas axilares responsáveis por brotações. As gemas que surgem nos nós são plenamente utilizadas para a propagação vegetativa, tendo em vista a praticidade e a viabilidade econômica quando comparado com a

semeadura. As estruturas que constituem o colmo podem se diferenciar em forma, tamanho e tonalidade na pigmentação, dependendo da espécie.

As folhas da cana-de-açúcar são constituídas de duas estruturas principais denominadas de lâmina e bainha. A bainha foliar se dispõe circundando o colmo e se fixando na base dos nós, delimitando-se com a lâmina por uma região denominada de colar. A lâmina foliar é uma estrutura plana estruturada pela presença de uma nervura central que se origina a partir da bainha. Estas estruturas podem apresentar coloração e pilosidade mais intensas de acordo com a espécie vegetal.

A inflorescência é do tipo panícula contendo milhares de flores hermafroditas muito pequenas. Esta inflorescência surge na extremidade superior do colmo, sendo este capaz de gerar apenas uma única panícula.

O sistema radicular presente na cana-de-açúcar é do tipo fasciculado, subdividindo-se em raízes adventícias e permanentes. Os rizomas são caules subterrâneos ricos em reservas nutritivas que se assemelha ao colmo por apresentar nós e entrenós subdividindo-o. Desta forma, surgem várias brotações nas gemas presentes nos nós que darão origem a vários colmos, denominados de perfilho em sua fase inicial.

A caracterização morfológica entre indivíduos presente no gênero *Saccharum* são comumente utilizadas na diferenciação varietal e descrição taxonômica de indivíduos, tornando-se fator constante nos programas de melhoramento.

2.2. MELHORAMENTO GENÉTICO

Até o século XX, a espécie *Saccharum officinarum* foi amplamente cultivada em diversos países, no entanto, objetivando elevar a produtividade e ampliação da área produtiva, diversos estudos divulgaram aspectos relacionados ao florescimento e a formação de sementes em cana-de-açúcar (RAO, 1980). Devido à necessidade de obtenção de vegetais resistentes a doenças, cientistas da Índia e de Java, por meio de estudos contínuos com hibridização, desenvolveram híbridos interespecíficos entre as espécies poliploides *S. officinarum* e *S. spontaneum*, conservando as características nobres presentes na *S. officinarum* e adicionando as características rústicas presentes na *S. spontaneum* (MING *et al.*, 2006).

A espécie *S. spontaneum* possui número cromossômico total ($2n$), variando de 40 a 128, com $x=8$, podendo possuir de cinco a dezesseis cópias de cada um dos oito cromossomos, enquanto a espécie *S. officinarum* possui número cromossômico ($2n$) igual a 80, com $x=10$, o que significa ter oito cópias de cada um dos dez cromossomos (D'HONT *et al.*, 1998; CUADRADO *et al.*, 2004).

A característica genética dos híbridos interespecíficos da primeira geração ocorre pela transmissão de células $2n + n$ para formação das sementes híbridas. Este fato ocorreu devido a uma falha durante o processo meiótico, não ocorrendo à redução cromossômica, tornando gametas iguais às células somáticas. Desta forma, o óvulo anormal de *S. officinarum* foi fecundado pelo pólen haploide advindo de *S. spontaneum* (ALLARD, 1960; SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2001). Após o processo de retrocruzamento, os híbridos originados caracterizaram-se pelo cruzamento do tipo haploide.

Com a finalidade de concentrar maior descendência genética nobre nos híbridos da primeira geração, diversos retrocruzamentos, efetuados de maneira sucessiva, foram realizados utilizando a espécie *S. officinarum*, como consequência, cerca de 80% das características genéticas presentes nos híbridos de cana-de-açúcar procedem de *S. officinarum* (Figura 2) (GRIVET *et al.*, 2004).

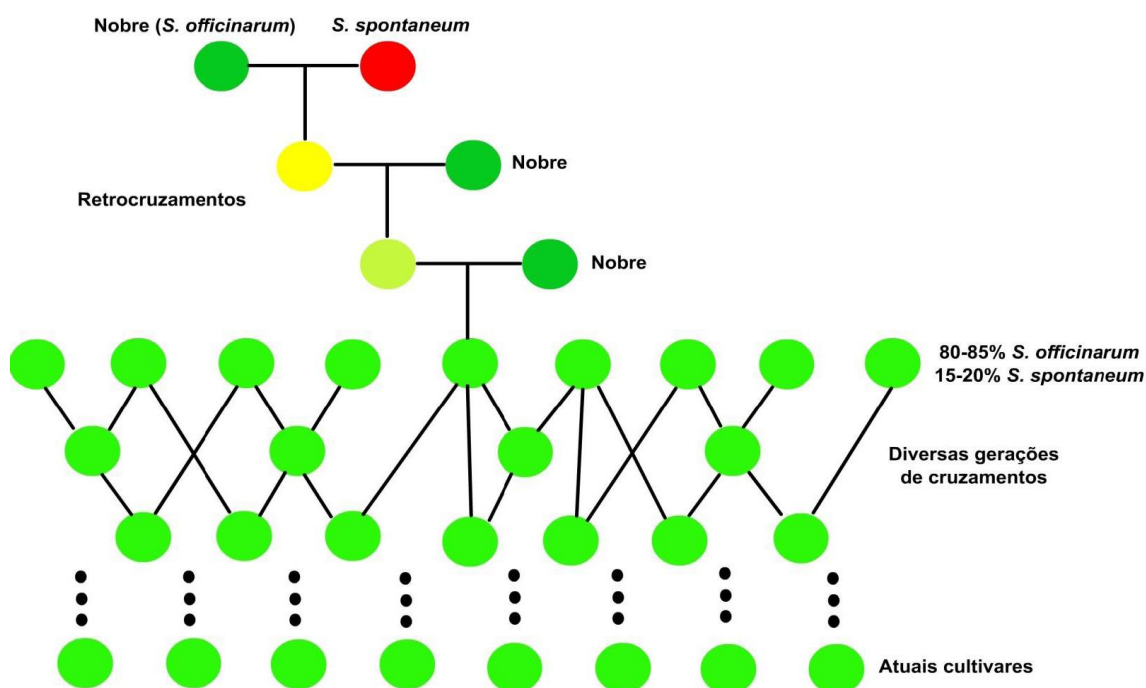


Figura 2 - Origem dos cultivares atuais de cana-de-açúcar. Este esquema mostra os cruzamentos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* até a formação dos híbridos atuais

No Brasil, o melhoramento da cana-de-açúcar iniciou em meados da década de 1920, por meio do Instituto Agrônomo de Campinas, sendo este responsável pelos primeiros cultivares desenvolvidas em território nacional, identificadas pela sigla do IAC (FIGUEIREDO, 2008). A partir da década de 1970 foram criadas o Planasucar e a Copersucar, o primeiro programa originou as variedades RB (República do Brasil), sendo administrado a partir da década de 1990 pelas Universidades e renomeado para RIDESA (RIDESA, 2014). O segundo programa originou as variedades SP (São Paulo), porém, em 2004 foi reestruturado e renomeado para Centro de Tecnologia Canavieira, originando cultivares com o prefixo CTC (COPERSUCAR, 2014). Em 2003 surge o mais novo programa de melhoramento canavieiro do país a empresa Canavialis, atualmente marca comercial da Monsanto (CANAVIALIS, 2014).

O processo de desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar consiste inicialmente na seleção dos progenitores por meio dos acessos presente em um banco de germoplasma com diversidade gênica elevada. Cruzamentos biparentais ou multiparentais tem sido a principal estratégia dos programas de melhoramento. No cruzamento biparental se conhece os dois progenitores, já no multiparental somente o progenitor feminino é conhecido (LANDELL e BRESSIANI, 2008). A partir das características desejadas, realiza-se a seleção dos melhores indivíduos que unam entre vários fatores, produtividade, resistência a pragas e doenças e tolerância ao déficit hídrico (BERNET *et al.*, 2003).

Em sua última apresentação de novas variedades, a RIDESA tornou disponível a liberação de treze novos genótipos, atingindo atualmente um total de 78 RBs desenvolvidas e cultivadas no Brasil. Dentre as novas variedades, a Universidade Federal de Alagoas é detentora da proteção das variedades RB931003, RB931011, RB951541, RB98710 e RB99395. A RIDESA adquiriu espaço progressivamente no cultivo de cana-de-açúcar no cenário nacional, conquistando um total de 58% dos canaviais do país na safra 2008/2009 e posteriormente um total de 62% das variedades plantadas e cultivadas no Brasil na safra 2011/2012. Posicionando-se na segunda posição, o Centro de Tecnologia Canavieira foi responsável por 33,9% dos canaviais cultivados nacionalmente, desta porcentagem, 5,2% correspondem às variedades desenvolvidas nos últimos 10 anos, nomeadas com o prefixo CTC (RIDESA, 2010 e 2014).

O surgimento de novas variedades está relacionado com necessidades ambientais, econômicas e energéticas, que assolam o setor canavieiro. Atualmente, a implantação de um canavial exige elevada estratégia quanto à escolha de uma variedade adaptável ao clima e resistente a pragas e doenças presentes na região, além de características genotípicas que melhor viabilizem a obtenção do produto final. O desenvolvimento e cultivo de variedades com maior concentração de fibra para geração de energia e produção de etanol de segunda geração (CTC, 2014; GRANBIO, 2014), sem desequilibrar os níveis de sacarose mínimos para obtenção dos demais subprodutos do setor canavieiro, é a mais nova contribuição dos programas de melhoramento da cana-de-açúcar.

2.3. O CULTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR

De acordo com James (2004), o momento histórico e o local de cultivo de cana-de-açúcar no mundo são incertos, porém estima-se que a cerca de 10.000 a.C. na região de Papua-Nova Guiné e na Polinésia já se cultivava cana-de-açúcar, entretanto, a produção de açúcar só iniciou por volta de 400 a.C., na China.

Os portugueses, durante o século XV, introduziram o cultivo da cana-de-açúcar na Ilha Madeira, localizada no oceano Atlântico, tornando-se o primeiro povo a dominar o cultivo da cana-de-açúcar. Por meio da colonização portuguesa o cultivo canavieiro chegou ao Brasil durante o século XVI, distribuindo-se inicialmente na atual região do Estado de São Paulo. Ao ser cultivado no litoral nordestino, os canaviais desenvolveram alta produtividade, sendo esta região detentora de grandes latifúndios no decorrer dos anos. Entretanto, durante o século XX a região Sudeste, em especial o Estado de São Paulo, destacou-se pela alta produtividade e expansão na área plantada, tornando-se atualmente o maior produtor em território nacional (MAPA, 2007).

2.4. ASPECTOS ECONÔMICOS

O setor agrícola possui impacto direto na economia de um país, principalmente devido aos insumos de produção, geração de emprego e lucro com o produto agrícola final. O açúcar é historicamente o produto de maior importância na economia

canaveira, dominando o destino de plantação até o surgimento do álcool combustível. Da mesma forma que o açúcar, o álcool é produzido a partir do processamento do caldo da cana-de-açúcar, sendo o destino produtivo do caldo direcionado de acordo com a demanda e economia mundial. Com importância relativamente menor, mas em ascensão, a bioeletricidade ganha destaque devido às crises energéticas. Desta forma, o setor canavieiro e seus subprodutos destacam-se na economia nacional, adquirindo importância tanto na agricultura quanto na indústria.

O cultivo em território nacional destaca-se desde o Brasil colônia, tornando-se, desta forma, o maior produtor mundial, com aproximadamente 670 milhões de toneladas em 2012, valor equivalente a 37% da produção mundial (FAO, 2014). Quanto à abrangência territorial, os canaviais ocupam cerca de nove milhões de hectares, o equivalente a 13,9% dos solos cultivados do Brasil, concentrando-se principalmente na região centro-sul do país (IBGE, 2014). O estado de Alagoas possui uma produção equivalente a 3,3% do total produzido nacionalmente, destacando-se como o maior produtor norte-nordeste de cana-de-açúcar, entretanto o estado de São Paulo possui 56,2% do total de produção (UNICA, 2014).

A produção de açúcar de cana-de-açúcar é bastante difundida, sendo o Brasil o maior produtor e exportador de açúcar do mundo, atingindo aproximadamente 38 milhões de toneladas durante a safra 2012/2013, sendo destes 70% destinados à exportação (UNICA, 2014). No cenário nacional a produção de açúcar está concentrada principalmente na região Centro-Sul, possuindo como principais produtores os estados de São Paulo (64%), Minas Gerais (9%), Paraná (8%), Goiás (5%) e Alagoas (4,6%) (UNICA, 2014).

O etanol ou álcool etílico é um produto comumente obtido por meio da fermentação e destilação do açúcar, desta forma, atendendo aos novos paradigmas que incidem os estudos sobre fontes energéticas, tornando-se uma alternativa do aquecimento global e da oscilação do preço do petróleo (ORTOLAN, 2006). Entretanto, somente na década de 1970 foi identificado seu potencial energético, como combustível automobilístico. Neste contexto, verifica-se que o etanol é o combustível renovável mais produzido e consumido do mundo, definindo os EUA e o Brasil como os maiores produtores em termos mundiais (UNICA, 2014). Apesar da elevada produção Norte-Americana, utilizando o milho (*Zea mays* L.) como matéria prima para obtenção de etanol, os custos ainda são elevados. Com a cana-de-açúcar

é possível atingir um rendimento médio de 7.500 litros de etanol por hectare enquanto o milho produz em média 4.000 litros de etanol por hectare, tornando a cana-de-açúcar a melhor opção para produção deste biocombustível (MOREIRA, 2000). Caracterizando, desta forma, um cenário propício para a ascensão produtiva deste combustível que atingiu cerca de 23 bilhões de litros de etanol durante a safra 2012/2013, possuindo como principais produtores os estados de São Paulo (50,6%), Minas Gerais (9,7%), Goiás (14,1%), Mato Grosso do Sul (8,1%) e Paraná (5,4%), enquanto o estado de Alagoas, posicionado na sétima posição, possui uma produção equivalente a 1,85% de todo o etanol produzido no Brasil (UNICA, 2014).

A conversão de biomassa em combustível é o mais novo sistema produtivo relacionado à bioenergia. Parte da palha da cana-de-açúcar que era deixada no campo agora é recolhida e será transformada em biocombustíveis e bioquímicos de segunda geração. Outros resíduos, como o bagaço da cana-de-açúcar e novas variedades energéticas, serão partes constituintes da síntese deste biocombustível. O etanol de segunda geração é sintetizado a partir da celulose e hemicelulose presentes nas fibras vegetais. Essas moléculas são quebradas em açúcares menores e fermentadas por leveduras geneticamente modificadas, convertendo-as em etanol (GRANBIO, 2014). Diferentemente da produção convencional, o etanol celulósico não é extraído diretamente do caldo da cana-de-açúcar, não gerando competição quanto à produção de alimentos.

A obtenção de energia elétrica em usinas de produção de etanol e açúcar é outra moderna atividade incluída na economia canavieira, capaz de promover crescente desenvolvimento no setor energético, agregando valor e expandindo-se no mercado. A obtenção energética consiste na utilização do material fibroso, oriundo da moagem de cana-de-açúcar, na alimentação de fornalhas, estas aquecem caldeiras responsáveis por liberar vapor de água para movimentar turbinas e produzir energia. Desta forma, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, que representam dois terços de seu total, podem ser aproveitados por completo (UNICA, 2014).

Do ponto de vista energético, grande parte das usinas brasileiras de cana-de-açúcar são autossuficientes, criando grande expectativa na utilização de biomassa para a geração de energia elétrica (SCARAMUCCI *et al.*, 2004).

2.5. CONDIÇÕES HÍDRICAS PARA CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Os estados do nordeste, principalmente Alagoas, conquistaram níveis elevados na produção canavieira devido ao surgimento de novas variedades adaptadas aos diversos fatores antagônicos à produção, sejam estes bióticos ou abióticos. Entretanto, a soma da produção dos estados do nordeste atinge valores próximos a 10% de toda a produção nacional (UNICA, 2014), característica esta, possui relação com a má distribuição hídrica presente nos estados nordestinos.

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.

O entendimento dos processos fisiológicos da cana-de-açúcar e as interações desses com a baixa disponibilidade hídrica se torna a base para a maioria das decisões tomadas pela indústria sucroalcooleira mundial, desde a seleção de genótipos à utilização de infraestrutura na irrigação. Desta forma, grande parte das pesquisas fisiológicas em ambientes controlados vem sendo realizadas a fim de otimizar a utilização agrícola de determinados ambientes (LISSON *et al.*, 2005).

De maneira geral, apesar da enorme necessidade hídrica, os vegetais possuem uma reduzida produção orgânica em relação à absorção total de água pelas raízes. No entanto, por menor que seja o déficit hídrico, a interrupção deste fluxo pode causar déficit hídrico e mau funcionamento de inúmeros processos celulares (TAIZ E ZAIGER, 2002, p.61). O estresse hídrico altera fisiologicamente a captura de radiação, temperatura foliar, condutância estomática, transpiração, transporte de elétrons, fotossíntese e respiração, 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 (SILVA *et al.*, 2007).

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 *et al.*, 2007).

A tolerância fisiológica de plantas à baixa disponibilidade hídrica é exercida por meio de mecanismos como: ajuste osmótico, síntese de antioxidantes e manutenção do crescimento radicular e foliar (SCHROEDER *et al.*, 2001). Alguns estudos demonstraram que a regulação da transpiração pelos estômatos é um mecanismo de defesa primário que impede a perda de água sob condições de seca (SCHROEDER *et al.*, 2001; SIRICHANDRA *et al.*, 2009). Os estômatos são poros microscópicos distribuídos na superfície das folhas e caules, rodeado por duas células-guardas altamente especializadas. A abertura e fechamento dos poros, em resposta a sinais internos e estímulos ambientais, permite a planta lidar com as necessidades conflitantes garantindo a absorção adequada de CO₂ para a fotossíntese e impedindo a perda de água pela transpiração (SCHROEDER *et al.*, 2001). De acordo com a intensidade e duração do déficit hídrico, o ácido abscísico (ABA) é acumulado, tornando-se um componente sinalizador que induz o fechamento estomático, reduzindo a transpiração de água pelas folhas (CHRISTMANN *et al.*, 2006; SIRICHANDRA *et al.*, 2009). Evidências crescentes indicam que fatores de transcrição possuem papel relevante como moduladores das respostas fisiológicas em células-guardas (COMINELLI *et al.*, 2001; XIE *et al.*, 2010). Segundo Seo *et al.* (2009), o fator de transcrição pertencente à subfamília MYB96 atua na resposta ao estresse hídrico em *Arabidopsis*, promovendo a regulação do gene RD22 e síntese de ABA e de auxina, possibilitando modulações estomáticas.

O melhoramento genético tem proporcionado grandes avanços no incremento da produção com o desenvolvimento de novos cultivares mais adaptados aos variados ambientes de cultivo. Porém, a disponibilidade de água é um fator limitante, desta forma, buscar desenvolver cultivares que apresentem tolerância ao estresse hídrico tem sido prioridade no Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar (PMGCA) e alguns genótipos têm sido obtidos.

2.6. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

Os recentes avanços da biotecnologia, com desenvolvimento de técnicas de genética molecular, genoma da cana-de-açúcar, transformação genética e proteômica

têm possibilitado aumentar a eficiência do melhoramento genético por meio do estudo e isolamento de genes para diversas características (EK *et al.*, 2005).

Várias tecnologias foram desenvolvidas para estudar e quantificar o transcriptoma, entre estas, a SSH (*Subtractive Suppression Hybridization*) permite identificar genes a partir de RNA extraído de tecidos com expressão diferencial para uma determinada característica. O método consiste na construção de bibliotecas de cDNA enriquecidas que contenham apenas os genes com expressão diferencial entre as duas condições estudadas (DIATCHENKO *et al.*, 1996). Por fundamentar-se metodologicamente na hibridização entre sequências, sendo uma dessas representadas pelos *microarrays* de nucleotídeos conhecidos, sintetizados a partir do estudo de sequências disponíveis na literatura científica, esta técnica está limitada a detecção de sequências genômicas existentes, enquanto a utilização de novos estudos moleculares tem proporcionado alternativas para o mapeamento do transcriptoma, com destaque para os métodos de RNA-Seq e HiCEP.

2.6.1. GENES DE REFERÊNCIA POR MEIO DE RT-PCR

A técnica da PCR consiste na síntese *in vitro* de novas moléculas de DNA, a partir de um DNA molde, de níveis térmicos adequados e de um conjunto de moléculas similares as que estão presente na habilidade natural de replicação do ácido desoxirribonucleico em um organismo vivo. A amplificação molecular necessita do conhecimento prévio dos nucleotídeos que constituem, ao menos, parte da molécula do DNA molde, para a síntese de oligonucleotídeos ou sondas que se anelam a região alvo (YANG e ROTHMAN, 2004). Esses oligonucleotídeos são também denominados de iniciadores ou *primers*. A enzima usada na amplificação por PCR deve ser capaz de: gerar novas fitas de DNA a partir de um DNA molde e *primers*; e ser resistente ao aquecimento. A *Taq* DNA polimerase oriunda do microrganismo *Thermus aquaticus* é uma das enzimas que apresenta tais características, sendo predominante sua utilização na biologia molecular (VALASEK & REPA, 2005).

A metodologia de amplificação de DNA é constituída por três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação, a dupla fita de DNA é separada em duas fitas simples por uma temperatura de aproximadamente 95 °C. Em seguida, a temperatura é reduzida para aproximadamente 55 °C, para que ocorra a

etapa de anelamento, na qual os iniciadores serão hibridizados à sequência complementar presente no DNA molde. Por fim, a temperatura é elevada para aproximadamente 70 °C, onde a enzima DNA polimerase realiza o processo de extensão, adicionando nucleotídeos complementares ao DNA molde, tendo como ponto inicial o oligonucleotídeo hibridizado à molécula em fita simples de DNA e finalizando após originar uma cópia da sequência alvo. Por se tratar de um processo cíclico e exponencial, após a última etapa, a amplificação é novamente iniciada e o número de cópias é duplicado ao final de cada ciclo.

Apesar da evolução dos estudos em biologia molecular, a técnica da PCR, inicialmente, possuía limitações quanto as moléculas e tecnológicas de automação utilizada em análises quantitativas, pela dificuldade em quantificar a amplificação. Entretanto, para obter análises do tipo quantitativa, ferramentas foram desenvolvidas para superar a problemática existente, surgiu então a técnica *real-time* PCR também chamada de PCR quantitativo (qPCR).

A *real-time* PCR é uma vertente da PCR capaz de quantificar a amplificação pela utilização de moléculas fluorescentes que interagem com a amplificação absorvendo e emitindo feixes de luz com comprimentos de ondas específicos. Dentre os fluoróforos, as sondas *Taqman*, que emite fótons a partir de ativação da polimerase; as moléculas *beacons*, que emitem fótons a partir da hibridização da mesma junto a sequência alvo da fita de DNA; e o *SYBR Green*® são as moléculas mais usadas na análise em *real-time* PCR. Dentre estas, o *SYBR Green*®, capaz de emitir fótons com maior intensidade apenas quando ligado à dupla fita de DNA no final da extensão, destaca-se pelo baixo custo em relação aos demais. Ao final de cada ciclo, é possível observar por meio de um computador, a discriminação quantitativa entre amostras (ANDERSEN *et al.*, 2006).

A precisão da quantificação está relacionada à transição da fase exponencial de amplificação para a fase do platô, esta última caracterizada pela ausência de amplificação. Nesta situação, o ponto que determina o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (C_t)

Devido a tais características aliada a elevada eficiência, reprodutibilidade e menor risco de contaminação a *real-time* PCR se expandiu rapidamente nos laboratórios de pesquisa gênica (HEID *et al.*, 1996). Por outro lado, a maior

desvantagem dessa tecnologia é o alto custo de seus reagentes e equipamentos (WONG & MEDRANO, 2005).

Baseado em uma maior precisão da análise em *real time*, a normatização dos dados é essencial para estudos de expressão gênica. Esse processo fundamenta-se na redução de fatores que contribuem para sub ou superestimar os reais valores quantitativos. Assim, define-se como referência um fator capaz de se expressar sob níveis similares, independente do tecido analisado, da quantidade do material genético e dos tratamentos submetidos às amostras, desta forma, genes constitutivos que não necessitam de reguladores, classificados como *housekeeping*, normalmente são selecionados como referência (WONG & MEDRANO, 2005; BOWER *et al.*, 2007).

Os *housekeeping* são genes de manutenção celular que, teoricamente, codificam proteínas vitais, sob níveis similares de expressão gênica em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento (BUSTIN, 2000), porém, os níveis de expressão estão relacionados aos tipos de tecidos, fases do desenvolvimento dos organismos e as condições experimentais (YOO *et al.*, 2009). Em geral, um gene de referência adequado é caracterizado por ser expresso de forma estável entre as diferentes amostras utilizadas sem ser afetado pelo tratamento experimental. Atualmente, varios *housekeeping* como β -Actina, α - e β -Tubulina e GAPDH são utilizados como genes de referência em estudos relacionados a expressão gênica (ISKANDAR *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2009 e 2011). Entretanto, alguns estudos demonstraram que muitos dos genes tidos como referência são inadequados para a normatização (CZECHOWSKI *et al.*, 2005; SCHMITTGEN & ZAKRAJSEK, 2000) e não se pode adotar um único gene de referencia em condições experimentais distintas (BIN *et al.*, 2012) Assim, torna-se necessário realizar uma avaliação sistemática de genes de referência, como um componente essencial de análise qPCR para melhorar a fiabilidade dos resultados sob determinada espécies e condições exrperimentais específicas.

A aplicação de genes de referência em estudo de expressão gênica é uma realidade observada em diversas pesquisas, como a expressão de genes em *Capsicum annuum* (BIN *et al.*, 2012), definição de genes de referência em resposta ao estresse abiótico em *Vigna mungo* (KUNDU *et al.*, 2013). Em poáceas, foram estudados os genes de referêcia sob condições de estresse abiotico em *Setaria italica* (KUMAR *et al.*, 2013) e a identificação de genes de controle interno mais apropriados

para RT-PCR em *Oryza sativa* (JAIN, *et al.*, 2006). Em relação a cultura da cana-de-açúcar, é possível observar estudos relacionados a: identificação de *housekeeping* envolvido na codificação da molécula fosfoenolpiruvato carboxilase (ALBERT *et al.*, 1992); comparação da expressão relativa de um conjunto de potenciais genes de referência em várias fases de desenvolvimento e em vários genótipos do complexo *Saccharum* (ISKANDAR *et al.*, 2004); análise da expressão gênica em cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico e identificação de genes regulados pelo estresse hídrico (RODRIGUES *et al.*, 2009 e 2011); Ling *et al.* (2014) selecionou genes de referência para a normalização da expressão gênica em cana-de-açúcar por Real Time RT-PCR quantitativo, entre outras pesquisas.

Atualmente, existem métodos capazes de avaliar a estabilidade da expressão de genes de referência. A análise estatística realizada por ferramentas como o *geNorm* (VANDESOMPELE *et al.*, 2002), Norm Finder (ANDERSEN *et al.*, 2004) e *BestKeeper* (PFAFFL *et al.*, 2004) são capazes de selecionar os genes mais adequados. O *geNorm* fornece uma medida da estabilidade de expressão gênica (M), esta é a variação entre os contrastes que envolve um gene individual e todos os outros genes testados. Os genes mais estáveis são identificados por apresentarem menores valores de M, conseqüentemente, quanto maior o valor de M menor será a estabilidade do gene de referência (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). O *geNorm* também é capaz de realizar exclusões graduais dos genes menos qualificados, possibilitando identificar a melhor combinação entre dois genes de referência. A abordagem *NormFinder* consiste em encontrar um valor de estabilidade para todos os genes candidatos organizados em um determinado número de grupos com base nas variações intragrupos e intergrupos, combinando ambos os resultados em um valor de estabilidade para cada gene de referência (ANDERSEN *et al.*, 2004). O *BestKeeper* é um aplicativo *software* Excel capaz de avaliar a estabilidade de genes candidato a partir do coeficiente de correlação (r) entre os valores de C_t de cada gene analisado e a média geométrica C_t de todos os genes de referência estudados. Assim, quanto maior for o coeficiente de correlação, maior a estabilidade de expressão do gene. Por meio do *BestKeeper* também é possível calcular o coeficiente de variação e o desvio padrão dos valores de C_t , estimando a estabilidade de expressão dos genes analisados (PFAFFL, *et al.*, 2004). Estas ferramentas possuem aplicabilidade crescente, sendo utilizadas em diversos trabalhos sejam estes relacionados à área

microbiana (NIETO *et al.*, 2009), humana (MEHTA *et al.*, 2010), animal (PARK *et al.*, 2013; HIBBELER *et al.*, 2008) ou vegetal (LING *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2012; MAROUFI *et al.*, 2010; PAOLACCI *et al.*, 2009).

A escolha de um gene de referência é uma tarefa que exige perícia e cautela, no entanto, a utilização de mais do que apenas um sistema de análise de expressão gênica pode otimizar a seleção de um ou mais genes de referência.

Portanto, o conhecimento das respostas fisiológicas da cana-de-açúcar ao estresse hídrico, a identificação e associação dessas respostas a um fator genético ou conjunto gênico e isolamento destes genes, permitirão acelerar o melhoramento e o ganho genético por meio da introdução direta desses genes em variedades com outras características importantes, como teor de sacarose, fibra e resistência a pragas e doenças. Entretanto, a primeira etapa para estudos de expressão gênica está relacionada à análise de genes de referência em RT-PCR.

3. OBJETIVO GERAL

Analisar genes de referência em RT-PCR associados com estresse hídrico em genótipos de cana-de-açúcar.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar na literatura genes desenvolvidos e usados como fatores de referência em cana-de-açúcar.
- Desenvolver novas sequências de genes de referência para cana-de-açúcar, desenvolvidos e usados como fatores de referência em outras culturas a partir das informações presentes na plataforma NCBI.
- Analisar a expressão dos genes selecionados por meio de análise de variância e verificar qual obteve a melhor estabilidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Experimento de estresse hídrico

O experimento foi realizado utilizando as variedades RB72454 e RB72910, esta última, classificada pelo Programa de Melhoramento Genético da cana-de-açúcar/RIDESA com maior tolerância ao estresse hídrico, baseado em dados fisiológicos e de produtividade. Todo o material foi cultivado para ser submetido a dois tratamentos: Indução ao estresse hídrico e controle com manutenção da irrigação.

O experimento foi realizado entre Setembro de 2013 e Janeiro de 2014 em condição de campo, na estação experimental do *Campus Arapiraca* (9°41'57.8"S 36°41'09.6"W) no delineamento experimental em parcela subdividida em faixa, com quatro repetições, sendo a parcela principal arranjadas em blocos casualizados. Cada parcela foi constituída por fileira única com 2 metros de comprimento. Como bordadura utilizou-se a variedade RB72910. Após 135 dias de crescimento vegetal sob condições hídricas favoráveis, o estresse hídrico foi estabelecido por meio da suspensão da irrigação e verificação diária de ausência da precipitação por meio de pluviômetro. Após 15 dias de estresse foi realizada a análise fisiológica e extração do RNA vegetal. Os Dados climáticos obtidos da estação meteorológica da Universidade Federal de Alagoas, localizada próximo a área experimental da mesma instituição, estão presentes no anexo A. Para avaliar o estado de estresse hídrico das plantas submetidas aos tratamentos, foi realizada a análise fisiológicas de condutância estomática (g_s), transpiração (E) e taxas fotossintética (A) entre as 10:00 e as 14:00 horas, em duas plantas por parcela, empregando o equipamento IRGA, com fluxo de ar de 300 mL min^{-1} e fonte de luz acoplada de $1000 \text{ mmol}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LI-6400XT, EUA), segundo as instruções do manual do fabricante do equipamento. 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).

Foram coletadas folhas das variedades RB72910 (mais tolerante) e RB72454 (menos tolerante) submetidas ao controle e ao estresse hídrico, por serem caracterizadas pelos programas de melhoramento como tolerante e susceptível ao déficit hídrico, respectivamente. Para cada tratamento-genótipo foi realizado a coleta de três repetições biológicas e posteriormente extração do RNA total.

Extração do RNA e síntese do cDNA

A extração do RNA ocorreu quando as plantas submetidas ao estresse hídrico alcançaram aproximadamente 30% da taxa fotossintética presente no tratamento controle. Em cada planta avaliada foi coletado aproximadamente 15 cm da parte mediana das folhas +2, estas foram conservadas em nitrogênio líquido até serem maceradas por meio de almofariz e pistilos. O RNA total, juntamente com o DNA genômico, foi extraído de três plantas por genótipo-tratamento utilizando o kit *PureLink®* (Life Technologies Corporation), seguindo as instruções dos fabricantes. Desta forma, tivemos três repetições biológicas para cada um dos seguintes contrastes: RB72910-Controle, RB72910-Estressado, RB72454-Controle e RB72454-Estressado. Em seguida verificou-se a qualidade da extração por meio de gel de agarose 1%, onde visualizou-se três bandas bem definidas, sendo a banda superior o DNA genômico enquanto as duas bandas inferiores são identificadas como o RNA ribossômico (Figura 3A).

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se 3,5 µg do RNA total extraído, 1X *First-Strand*, 40 unidades da enzima Transcriptase Reversa AMV (20 units/mL). A reação foi incubada a 42 °C por 1 hora e 30 minutos, verificando-se a qualidade da síntese em gel de agarose 1%, onde o DNA genômico está presente na parte superior do gel. O procedimento para síntese de cDNA, seleciona apenas sequências que possuem calda poli-A, utilizando o RNA mensageiro e não selecionando o RNA ribossômico, desta forma, o que se vê no gel são várias sequências de cDNA com tamanhos distintos (Figura 3B).

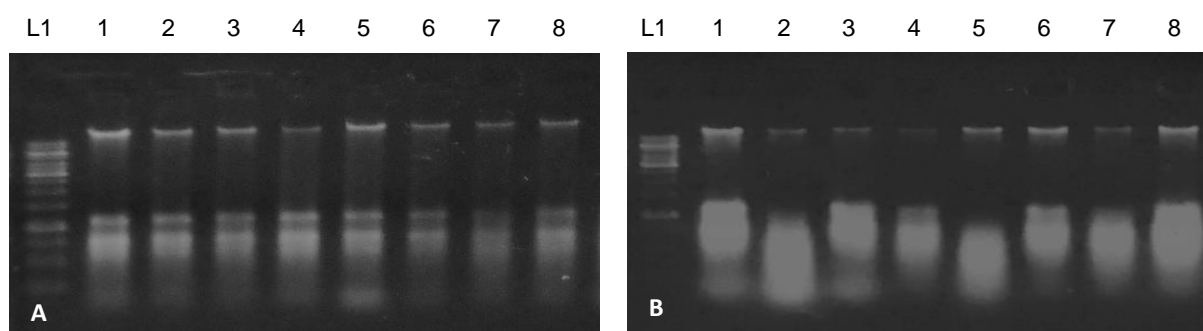


Figura 3 – Eletroforese em gel com concentração de 1% de agarose. Em A, pode-se visualizar a qualidade da extração de RNA, enquanto em B, verificou-se a qualidade da síntese de cDNA. As colunas L1 representam o DNA de peso molecular conhecido (1 kilo bases), as colunas 1 e 2 representam a variedade RB72454 sob controle, as colunas 3 e 4 representam a variedade RB72910 sob controle, as colunas 5 e 6 representam a variedade RB72454 sob estresse e as colunas 7 e 8 representam a variedade RB72910 sob estresse

Síntese dos iniciadores

Os iniciadores dos genes Histona e β -Tubulina foram encontrados na literatura e sintetizados sem modificação de sua sequência original. Para os demais, realizou-se um levantamento na literatura publicada e disponível na base de dados do NCBI, objetivando selecionar *housekeeps* com potencialidade de referencial endógeno. Dos seis genes selecionados, apenas o GAPDH e o β -Actina estão identificados no banco de dados referente ao genoma funcional da cana-de-açúcar. Para utilização dos genes Alongamento, Ciclofilina, Ubiquitina e α -Tubulina, foi realizada análises de homologia por meio da plataforma Blast usando sequências de *Arabidopsis*, confirmando a presença da sequência dos genes no genoma da cana-de-açúcar (Tabela 1). A partir destes genes, os iniciadores foram projetados usando a ferramenta *Primer design* do PCR *real time*.

RT-PCR quantitativa

A reação de *real-time* PCR foi realizada usando-se *SYBR Green Master Mix* (*Thermo Scienfic*) em um termociclador *ABI StepOne Real Time PCR System*. Para cada gene, foram utilizados três replicatas e analisadas independentemente. Cada reação foi constituída de 0,2 mg de cDNA, 25 nM de *primer*, 12,5 μ L de *SYBR Green Master Mix* e completado o volume para 25 μ L. A amplificação foi feita usando 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundo, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos.

Tabela 1 – Sequência de *primers* de genes usados em *real time* PCR.

Acesso GenBank ^a	Nome do gene	Sequência dos <i>primers</i>	
		Forward	Reverse
EF581011	Alongamento	GCGCCGTAACCGTATCAT	ACCCATGGCTGAAGGAAAT
GQ246462	Ciclofilina	GCCCTCCCCTCCGTCAT	TCACCATCATCTTATTCAGATCGAA
CA254672	GAPDH	TCACCCTCAAGGACTCCAAGA	GGGTTCTGATGCCAAAGAC
CA116806	Histona*	CGCACACGCACACTGAAAG	CGGTGGCCATGATCAAAAA
AF093505	Ubiquitina	AGCCTCACGGGACTCTTTCTC	TGGATGGATGAGGCAAGGA
JQ230105	α -Tubulina	GCACCATGCCAGTGATACC	GAACCGGTCTCGCTGAAGAA
CA14816	β -Actina	CCACACTGTGCCATTTACG	ACGGCCAGCAAGATCCAA
CA222437	β -Tubulina*	GGAGGAGTACCCTGACAGAATGA	CAGTATCGGAAACCTTTGGTGAT

^a Número de acesso do gene na base de dados do NCBI.

* Desenvolvidos por Rodrigues *et al.* 2009.

Análise estatística dos genes de normalização

A estabilidade dos genes candidatos à normalização em cana-de-açúcar sob estresse hídrico e controle foi avaliada por meio do pacote de *software* com base no Microsoft Excel: *geNorm* (VANDESOMPELE *et al.*, 2002), *NormFinder* (ANDERSEN *et al.*, 2004) e *BestKeeper* (PFAFFL *et al.*, 2004), além da utilização do programa R. Todas as análises utilizaram como base os resultados de C_t disponíveis na qPCR. As análises foram realizadas de acordo com os respectivos manuais de instrução.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

Análise fisiológica vegetal

Por meio dos resultados experimentais (Anexo B), foi possível discriminar a redução de trocas gasosas ao avaliar a taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração. A análise estatística dos dados fisiológicos, ao nível de 5% de probabilidade utilizando o teste tukey por meio do programa R, indicou diferença significativa apenas entre tratamentos, enquanto os genótipos e as interações não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 2). Desta forma, a taxa fotossintética (A), a transpiração (E) e a condutância estomática (g_s) apresentaram diferença estatística quando relacionadas aos tratamentos: Estresse e Controle.

Todos os fatores fisiológicos, resultante do tratamento controle hídrico, apresentaram redução significativa quando confrontado com o tratamento estresse hídrico. Resultado semelhante foi observado em um estudo de trocas gasosas em variedades de cana-de-açúcar desenvolvido por Gonçalves *et al.* (2010), neste, observou-se redução em todas as variáveis de trocas gasosas. Assim como Gonçalves *et al.* (2010), observamos a variação entre genótipos sob estresse hídrico, sendo o genótipo RB72454 a única variedade em comum entre os dois estudos. Em nossos resultados, observamos reduções nas taxas fotossintéticas, porém com diferença estatística ausente entre cultivares, já Gonçalves *et al.* (2010), observou entre as variedades SP79-1011, RB72454, RB92579 e RB98710 que: o genótipo RB72454 foi o único que apresentou redução significativa em relação à condutância estomática; a variedade RB98710 foi a única que não foi influenciada pelos tratamentos, diferindo das demais; e todos os genótipos apresentaram declínio

acentuado quanto a taxa fotossintética. As diferenças entre os resultados deste trabalho e os de Gonçalves *et al.* (2010), está relacionada a utilização de outros genótipos, isto pode ser confirmado pela similaridade encontrada quando observamos isoladamente o desempenho do genótipo RB72454.

Tabela 2 - Análise de variância para os fatores fisiológicos sob estresse hídrico e controle: A (taxa fotossintética); E (transpiração); g_s (condutância estomática).

	GL	QM		
		A	E	g_s
Tratamentos (T)	1	1954,44486 **	44,97265 **	0,03951 **
Genótipos (G)	1	0,23273 ns	0,03310 ns	$1,1 \times 10^{-6}$ ns
T*G	1	35,50559 ns	0,32336 ns	0,00027 ns
Replicatas/repetições	4	15,23473 ns	0,65874 ns	0,00037 ns
Resíduo	24	24,54667	0,57002	0,00061
CV%		34,57%	42,56%	32,59%

Os valores médios de transpiração foliar (E) variaram de $3,43 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, presente no tratamento em capacidade de campo, para $1,08 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ atribuído ao tratamento em estresse hídrico (Figura 4). Por sua vez, a condutância estomática (g_s) também apresentou um decréscimo acentuado de $0,084 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para $0,021 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ quando submetida, respectivamente, aos tratamentos em capacidade de campo e estresse hídrico (Figura 4), este resultado sugere que o fechamento estomático é uma das primeiras reações fisiológicas nos vegetais para reduzir a transpiração quando expostos a déficit hídrico. Tanto a transpiração foliar quanto a condutância estomática apresentaram resultados semelhante aos obtidos por Gonçalves *et al.* (2010), este, ainda sugere que a redução proporcional entre a transpiração e condutância estomática está relacionada a redução do fluxo de vapor d'água para a atmosfera a medida que os estômatos são fechados. Segundo Arias *et al.* (1996), apesar de estar diretamente relacionada a disponibilidade hídrica na fase juvenil da cana-de-açúcar, a transpiração foliar também é influenciada pelo enrolamento foliar ocasionado pelo déficit hídrico.

Para a variável taxa fotossintética (A), os genótipos apresentaram valores médios correspondentes a $22,14 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $5,32 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para os tratamentos controle e estresse, respectivamente (Figura 4), resultado semelhantes foi encontrado por Gonçalves *et al.* (2010), principalmente quanto aos resultados da variedade RB72454, única variedade presente em ambos os estudos. Estando a

fotossíntese relacionada diretamente à absorção de água e trocas gasosas, a produção de fotoassimilados por um vegetal submetido ao estresse hídrico é limitada fisiologicamente pelo fechamento estomático.

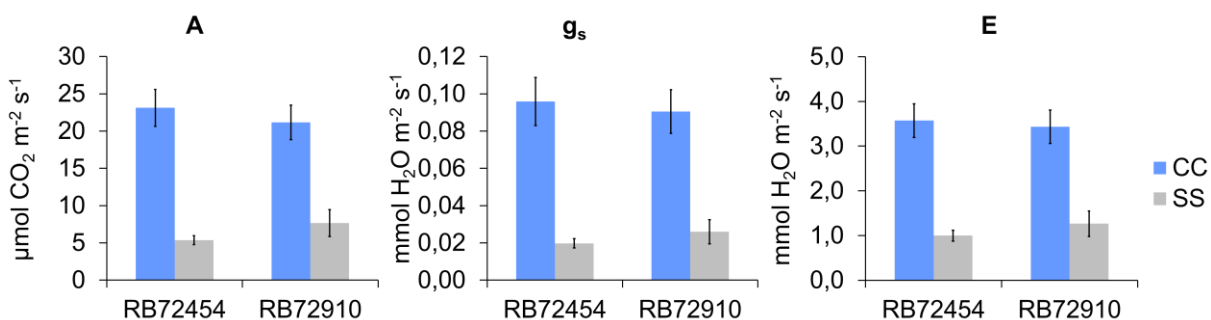


Figura 4 – Representação gráfica das variedades RB72454 e RB722910 relacionadas à taxa fotossintética (A), transpiração foliar (E) e condutância estomática (g_s) sob condições de capacidade de campo (CC) e estresse hídrico (SS).

Sob condições hídricas semelhantes, a média da taxa fotossintética obtida por meio do tratamento sem estresse hídrico foi similar à obtida em milho por Cruz (2010) e inferior aos resultados reunidos por Larcher (2004), nos quais a taxa fotossintética em poáceas varia de 30 a 60 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹, alcançando níveis próximos a 80 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ em condições ótimas de radiação, temperatura e fornecimento hídrico. A utilização da fonte de luz de 1000 μmol m⁻² s⁻¹, possivelmente permitiu a similaridade entre os nossos resultados e os obtidos por Gonçalves *et al.* (2010), entretanto, ambos não atingiram a saturação luminosa identificada por Larcher (2004) em gramíneas a partir da utilização de uma fonte de luz de 1500 μmol m⁻² s⁻¹.

Análises por real-time RT-PCR

Para análise de expressão gênica em cana-de-açúcar, foi utilizado o método de análise de qPCR avaliando a estabilidade de expressão de oito genes de referência em diferentes condições experimentais.

Um gene de referência ideal se expressa de forma regular, independentemente das condições experimentais a ele imposta. Entretanto, alguns estudos demonstraram que a expressão de genes de manutenção pode variar consideravelmente em condições experimentais distintas (THELLIN *et al.*, 1999). Isto pode ser explicado devido a participação dos genes *housekeeping* em diversas funções celulares (SINGH e GREE, 1993; ISHITANI *et al.*, 1996)

Neste estudo todos os ensaios de PCR foram feitos em triplicatas, a fim de confirmar a fiabilidade dos resultados . Os valores do C_t de cada gene de referência em diferentes condições experimentais foram utilizados para comparar os vários graus de seus níveis de expressão.

A variação nos níveis de genes de referência em cana-de-açúcar sob diferentes condições experimentais de expressão foi submetida a análise de variância a partir do limiar da fase exponencial da RT-PCR, possibilitando identificar diferença significativa entre os parâmetros: tratamento, gene e genótipo.

Os tratamentos empregados no experimento atingiram valores médios de C_t correspondente a 25,58 e 24,76 para os tratamentos em capacidade de campo e estresse hídrico, respectivamente. O gene GAPDH apresentou a menor média de C_t correspondente a 21,28 enquanto 30,93 foi a maior média de C_t , pertencente ao gene Ubiquitina. Os genótipos RB72910 e RB72454 apresentaram média de C_t correspondente a 24,91 e 25,76. Dentre as interações, apenas T*G (tratamento e gene) apresentou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 3).

Apesar da diferença significativa entre os genótipos e entre os genes (Tabela 3), pode-se observar que a interação dos genótipos com os genes não apresentou diferença significativa. Desta forma, a expressão dos genes de referência não modificou-se significativamente quando avaliadas junto as variedades de estudo.

Observa-se que existe diferença significativa na interação entre os genes e os tratamentos (Tabela 3), ou seja, os tratamentos influenciam diretamente na expressão de alguns genes de referência.

Tabela 3 - Análise de variância para o limiar da fase exponencial: C_t (*Cycle Threshold*).

Causas de variação	C_t	
	QM	
Tratamento (T)	3,9964	**
Gene (G)	353,8543	**
Genótipo (Gn)	17,8168	**
T*G	10,3653	**
T*Gn	2,0790	ns
G*Gn	1,6534	ns
T*G*Gn	0,6255	ns
Repetições/Genes	5,5614	**
Resíduo	1,0532	-
CV%	4,01%	

De acordo com a figura 5, pode-se observar o C_t dos genes nos tratamentos de acordo com os genes de referência de estudo. Os genes GAPDH e Alongamento apresentaram as expressões diferenciais mais semelhantes em relação aos tratamentos. Resultado semelhante foi observado por Iskandar *et al.* (2004), onde o GAPDH é definido como um gene de referência recomendado para estudos de expressão de outros genes de interesse, em diversos tecidos e genótipos de cana-de-açúcar. Em arroz, o gene de referência Alongamento apresentou maior estabilidade dentre os *housekeeping* avaliados (JAIN *et al.*, 2006).

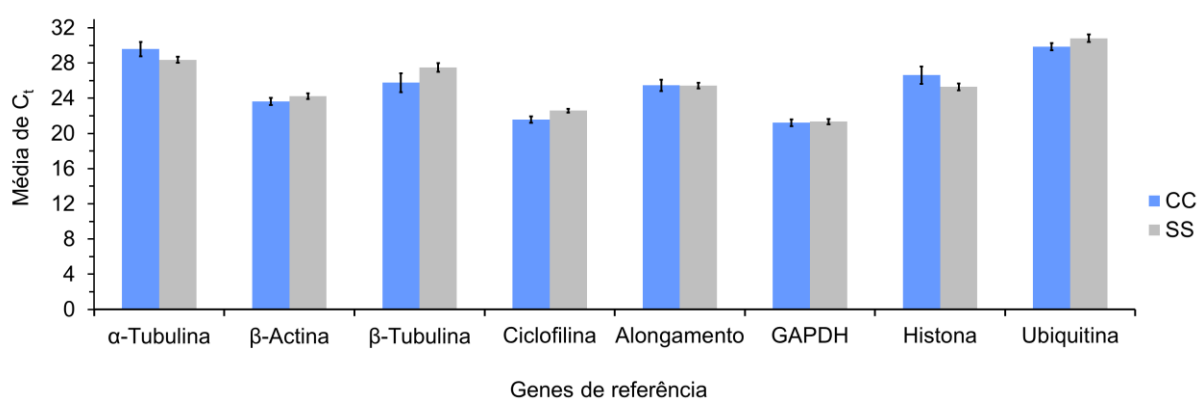


Figura 5 – Expressão diferencial de oito genes de referência em dois tratamentos: CC (Capacidade de campo) e SS (Estresse hídrico)

Quanto aos contrastes obtidos por meio dos dois tratamentos em relação às variedades, observa-se que a interação entre estes fatores não apresentou diferença significativa (Tabela 3).

A estabilidade da expressão gênica é a característica fundamental para identificação de um gene de referência. Desta forma, o gene GAPDH foi identificado com a maior estabilidade dentre os genes candidatos testados pelos *softwares* *geNorm*, *NormFinder* e *BestKeeper* (Tabela 4). Resultado semelhante foi observado por Ling *et al.* (2014) ao identificar, por meio dos *softwares* *geNorme* e *NormFinder*, o gene GAPDH como o mais estável dentre 13 genes de referência de cana-de-açúcar avaliados em diferentes tecidos vegetais em tubos de ensaio contendo as soluções de água, juntamente com os diferentes tratamentos, incluindo o ácido abscísico, jasmonato de metilo e ácido salicílico, durante 6 h; peróxido de hidrogênio, cloreto de

sódio e polietilenoglicol durante 12 h, além de cloreto de cobre e cloreto de cádmio durante 24h.

Nosso estudo utilizou alguns genes que não apresentaram estabilidade satisfatória, dentre eles o gene β -Tubulina foi comumente utilizado por Liu *et al.* (2014) para validar genes de referência em *Nicotiana benthamiana* sob inoculação viral, apresentando a mesma instabilidade. Entretanto, Maroufi *et al.* (2010), ao validar genes de referência para análise de expressão gênica em chicória (*Cichorium intybus*), identificou os genes Actina e Alongamento dentre os mais estáveis, enquanto o GAPDH apresentou estabilidade relativamente baixa. Estes resultados sugerem a importância de validar genes de referência específicos para tratamentos e organismo distintos.

De maneira geral, os três softwares mencionado, classificam o conjunto de genes candidatos de acordo com sua estabilidade de expressão em um determinado conjunto de dados experimental. A metodologia do *software geNorm* consiste na comparação da expressão dos genes candidatos em pares, para identificar qual contraste apresenta a melhor estabilidade, esta é identificada pelo índice M, para tanto é necessário transformar os valores C_t de todos os genes em quantidades relativas. Desta forma, o par de genes com menor valor de M é definido como o mais estável, tendo em vista, a exclusão gradual dos genes com maior instabilidade e o recálculo do índice genes restantes (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Assim, os genes GAPDH e β -Actina foram identificados pelo *software geNorm* como o par com melhor estabilidade dentre os genes candidatos. Considerando o valor máximo de $M < 1,5$ proposto pela metodologia do *geNorm*, apenas os genes GAPDH, β -Actina e Ciclofilina apresentam expressão com estabilidade confiável (Tabela 4).

Assim como o *geNorm*, o algoritmo *NormFinder* requer a conversão dos valores de C_t em quantidades relativas, entretanto, enquanto o primeiro realiza comparação aos pares, o segundo analisa a estabilidade dos genes individualmente, classificando genes com a menor variação como os de melhor índice de estabilidade (VANDESOMPELE *et al.*, 2002; ANDERSEN *et al.*, 2004). Desta forma, esse aplicativo identificou o gene GAPDH, β -Actina e Alongamento, respectivamente, com a primeira, segunda e terceira melhor estabilidade, enquanto o gene Histona apresentou o pior índice de estabilidade de expressão gênica.

Ao contrário dos anteriores, o *software BestKeeper* utiliza os dados brutos de C_t (PFAFFL, *et al.*, 2004). A partir do coeficiente de correlação (r) (Tabela 4), o *software BestKeeper* identificou os genes GAPDH ($r = 0,684$), β -Actina ($r = 0,675$), Alongamento ($r = 0,675$) e Ubiquitina ($r = 0,655$) com as melhores estabilidades, sendo estes os mais indicados para referência intrínseca. Ainda segundo as recomendações resultantes do aplicativo *BestKeeper*, a utilização do gene β -Tubulina ($r = 0,314$) como gene de referência é completamente desaconselhável, devido à instabilidade apresentada pelo mesmo.

Apesar da instabilidade observada em nossos resultados, o gene β -Tubulina identificado como potencial gene de referência por Iskandar *et al.* (2004) foi utilizado com controle positivo por Rodrigues *et al.* (2009) ao analisar genótipos de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico. Os resultados desse trabalho foram possivelmente influenciados pela má qualidade de estabilidade do gene β -Tubulina. Entretanto, em um novo estudo relacionado ao estresse hídrico em cana-de-açúcar, Rodrigues *et al.* (2011), utilizou o gene β -Actina como padrão endógeno. Desta forma, a utilização do gene β -Actina corrobora com nossos resultados, tendo em vista que este gene está entre os indicados pelos *softwares* como ideais para referência na expressão gênica.

Para uma análise conjunta o *software NormFinder* possibilita a combinação entre dois genes de referência, afim de otimizar a qualidade da normatização, desta forma, a combinação entre os genes Alongamento e β -Actina apresentou o melhor índice estabilidade, valor este correspondente a 0,01.

Os índices obtidos por meio dos três *software* não apresentaram, integralmente, a mesma classificação quanto ao valor de estabilidade, entretanto, por unanimidade, o gene GAPDH foi classificado como o mais estável, no entanto, o gene β -Tubulina foi identificado pelos *softwares geNorm* e *BestKeeper* com a pior estabilidade dentre os genes testados, enquanto o aplicativo *NormFinder* identificou o gene Histona com o respectivo perfil. Discrepância quanto a classificação dos genes dentre os *softwares* utilizados também puderam ser observadas nos estudos de Hibbeler *et al.* (2008), Nieto *et al.* (2009) e Paolacci *et al.* (2009). Essas diferenças podem estar relacionadas a metodologia de avaliação dos dados pelos respectivos aplicativos.

Tabela 4 – Classificação dos genes de referência quanto ao potencial de estabilidade de acordo com a metodologia de avaliação.

Genes	<i>geNorm</i>		<i>NormFinder</i>		<i>BestKeeper</i>	
	Índice M	Ranking	Estabilidade	Ranking	r	Ranking
GAPDH	1,337	1º	0,262	1º	0,684	1º
β -Actina	1,372	1º	0,288	2º	0,675	2º
Ciclofilina	1,402	2º	0,448	4º	0,471	5º
Ubiquitina	1,502	3º	0,473	5º	0,655	3º
Alongamento	1,656	4º	0,317	3º	0,675	2º
Histona	2,209	5º	0,772	8º	0,451	6º
α -Tubulina	2,228	6º	0,642	6º	0,531	4º
β -Tubulina	2,785	7º	0,745	7º	0,314	7º

6. CONCLUSÕES

1. Quando utilizado sem parceria, o GAPDH é o gene de referência mais adequado para estudos relacionados ao estresse hídrico em cana-de-açúcar.
2. A combinação entre os genes Alongamento e β -Actina apresentou o melhor valor de estabilidade.
3. O gene β -Tubulina apresenta as piores características de estabilidade relacionadas a um gene de referência.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, H. A.; MARTIN T.; SUN, SS. Structure and expression of a sugarcane gene encoding a housekeeping phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Molecular Biology**, v. 20, p. 663-671, 1992.
- ANDERSEN, C. B. et al. Equal Performance of TaqMan, MGB, Molecular Beacon and SYBR Green-based Detection Assays in Detection and Quantification of Roundup Ready Soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9658-9663, 2006.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, p. 5245–5250, 2004.
- ARIAS, M. I. B.; DELGADO, E. O.; CARMENATE, R. V. **Cambios fisiológicos de la caña de azúcar ante el déficit hídrico**. 1. ed. México: Universidad Autónoma Chapingo, 135p., 1996.
- ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 2. ed. New York: John Wiley and Sons, 341p., 1960.
- BACCHI, O.O.S. Botânica da cana-de-açúcar. In: ORLANDO FILHO J., Coord. **Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil**. Piracicaba: IAA/PLANALSUCAR, 1983. p.25-37.
- BERNET, G. P. et al. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. **Plant Breeding**, v. 122, p.146-152, 2003.
- BIN, W. S., et al. Evaluation of appropriate reference genes for gene expression studies in pepper by quantitative real-time PCR. **Molecular Breeding**, v. 30, p.1393-1400, 2012.
- BOWER, N. I. et al. Universal reference method for real-time PCR gene expression analysis of preimplantation embryos. **BioTechniques**, v. 42, p. 199-206, 2007.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169–193, 2000.

CANAVIALIS S.A. Canavialis. **Quem somos.** Disponível em: < <http://www.canavialis.com.br> >. Acesso em: 09 jan. 2014.

CHRISTMANN, A. et al. Integration of abscisic acid signalling into plant responses. **Plant Biology**, v. 8, p. 314–325, 2006.

COMINELLI, E. et al. Over-expression of the Arabidopsis AtMYB41 gene alters cell expansion and leaf surface permeability. **The Plant Journal**, v. 53, p. 53–64. 2008.

CIB. Conselho de informações sobre biotecnologia. Disponível em < <http://cib.org.br/> > Acesso em: 10 de março de 2013.

COPERSUCAR S.A. Copersucar. **Histórico.** Disponível em: < <http://www.copersucar.com.br> > Acesso em: 09 jan. 2014.

CRUZ, R. F. D. **Indução e recuperação do stresse hídrico em variedades portuguesas de milho.** 2006. 182 f. Dissertação (Mestrado em Biologia do estresse em Plantas) - Universidade do Minho, Braga - Portugal, 2006.

CUADRADO, A. et al. Genome remodelling in three modern *S. officinarum* × *S. spontaneum* sugarcane cultivars. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 847-854, 2004.

CZECHOWSKI, T. et al. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.139, p. 5–17, 2005.

DANIELS, J.; ROACH. B.T. Taxonomy and evolution. p.7-84, 1987. In: HEINZ, D.J. (Ed). **Sugarcane Improvement through Breeding.** Amsterdam: Elsevier. 603p. 1987.

D'HONT, et al. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, v. 41, p.221–225, 1998.

D'HONT, A. et al. Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars *Saccharum* spp. By molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics**, v. 250, p. 405–413, 1996.

DIATCHENKO L, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.12, p.6025–6030, 1996.

EK, M. et al. Microsatellite markers for powdery mildew resistance in pea (*Pisum sativum* L.). **Hereditas**, v.142, p. 86-91, 2005.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>>. Acesso em 09 jan. 2014.

FIGUEIREDO, P. Breve historia da cana-de-açúcar e do papel do instituto agrônômico no seu estabelecimento no Brasil. 2008. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Ribeirão Preto: IAC. 882p. 2008.

GONÇALVES, E. R. et al. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, p.378–386, 2010.

GRANBIO. Gran Investimentos S.A. Disponível em: <<http://www.granbio.com.br/produtos/biocombustiveis/>> Acesso em 10 jan.2014.

GRASSL, C. O. Problems relative to the origin and evolution of wild and cultivated Saccharum. Indian Journal of Sugarcane Research and Development. v8 p.106-116, 1964. In: GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J. C.; D'HONT, A. (Ed). A Review of Recent Molecular Genetics Evidence for Sugarcane Evolution and Domestication. **Ethnobotany Research & Applications**. v.2, p.9-17, 2004.

GRIVET, L. et al. A Review of Recent Molecular Genetics Evidence for Sugarcane Evolution and Domestication. **Ethnobotany Research & Applications**, v.2, p.9-17, 2004.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 122–127, 2002.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986-994, 1996.

HIBBELER, S.; SCHARSACK, J. P.; BECKER, S. Housekeeping genes for quantitative expression studies in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *BMC Molecular Biology*, v. 9, 2008.

IRVINE, J. E. Saccharum species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.186-194, 1999.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201404_4.shtm >. Acesso em 09 fev. 2014.

ISHITANI, K. et al. Chang Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture. **Journal of Neurochemistry**, v. 66, p. 928–935, 1996.

ISKANDAR, et al. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, p. 325-337, 2004.

JAIN, M. et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 646–651, 2006.

JAMES, G. An introduction to sugarcane. IN: JAMES, G. **Sugarcane**. 2. ed. Oxford Blackwell Science, p. 1-18 2004.

KUMAR, K.; MUTHAMILARASAN, M.; PRASAD, M. Reference genes for quantitative real-time PCR analysis in the model plant foxtail millet (*Setaria italica* L.) subjected to abiotic stress conditions. **Plant Cell Tiss and Organ Culture**, v. 22, p. 115:13, 2008

KUNDU A.; PATEL, A.; PAL, A. Defining reference genes for qPCR normalization to study biotic and abiotic stress responses in *Vigna Mungo*. **Plant Cell Reports**, v. 32, p. 1647–1658, 2013.

LANDELL, M. G. A. E BRESSIANI, J.A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal, 2008. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Ribeirão Preto: IAC. 882p. 2008.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2004. 531p.

LING, H. et al, Comprehensive Selection of Reference Genes for Gene Expression Normalization in Sugarcane by Real Time Quantitative RT-PCR. **Plos One**, v.5, 2014.

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

LIU, D. et al. Validation of Reference Genes for Gene Expression Studies in Virus-Infected *Nicotiana benthamiana* Using Quantitative Real-Time PCR. **Plos One**, v. 7, 2012.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Balanço nacional de cana-de-açúcar e agroenergia. Secretaria de Produção e Agroenergia – Brasília, MAPA/SPA, 139 p., 2007.

MAROUFI, A.; BOCKSTAELE, E. V.; DE LOOSE, M. Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v.11, 2010

MEHTA, R. et al. Validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples. **BMC Molecular Biology**, v. 11, 2010.

MING, R. et al. Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. **Plant Breeding Reviews**, v.27, p.15-118, 2006.

MOREIRA, J. C. Sugarcane for energy: recent results and progress in Brazil. **Energy for Sustainable Development**, v.4, p.43-54, 2000.

MUKHERJEE, S. K. Origin and distribution of *Saccharum*. Botanical Gazette. v.119, p.55-61, 1957. In: GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. (Ed). A Review of Recent Molecular Genetics Evidence for Sugarcane Evolution and Domestication. **Ethnobotany Research & Applications**. v.2, p.9-17, 2004.

NIETO, P.A. et al. Selection and evaluation of reference genes for improved interrogation of microbial transcriptomes: case study with the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **BMC Molecular Biology**, v. 10, 2009.

ORTOLAN, M. C. A. Perspectivas para o setor sucroalcooleiro brasileiro. 2006 In: SEGATO, S. V. et al (Ed.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livrocetes. 416p. 2006.

PAOLACCI, A.R. et al. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. **BMC Molecular Biology**, v. 10, 2009.

PARK S.J. et al. Selection of New Appropriate Reference Genes for RT-qPCR Analysis via Transcriptome Sequencing of Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*). **Plos One**, v. 8, 2013.

PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pairwise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 509-515, 2004.

RAO, P. S. Fertility seed storage and seed viability in sugarcane. In: **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, p.1236-1240, 1980.

RIDESA. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do setor Sucroalcooleiro. **Liberção nacional de novas variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do setor Sucroalcooleiro, Curitiba, 2010.

RIDESA. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do setor Sucroalcooleiro. **Histórico**. Disponível em <<http://www.ridesa.agro.ufg.br/>>. Acesso em 09 fev. 2014.

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

RODRIGUES, F. A. et al. Sugarcane genes differentially expressed during water déficit. **Biologia Plantarum**, v. 55, p. 43-53, 2011.

SCARAMUCCI, J. A. et al. Energy from sugarcane bagasse under electricity rationing in Brazil: a computable general equilibrium model. **Energy Policy**, v.34, p.986-992, 2004.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. Anatomia e Botânica, 2008. In: DINARDO-MIRANDA, L.L; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Ribeirão Preto: IAC. 882p. 2008.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL’AGNOL, M. Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, v.31, p.169-175, 2001.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 46, p. 69-81, 2000.

SCHROEDER, J.; KWAK, J. M.; ALLEN, G. J. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. **Nature**, v. 410, p. 327-330, 2001.

SEO, P.J. et al. The MYB96 Transcription Factor Regulates Cuticular Wax Biosynthesis under Drought Conditions in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 23, p. 1138–1152, 2011.

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

SINGH, R.; GREEN, M. R. Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Science**, v. 259, p. 365–368, 1993.

SIRICHANDRA, C. et al. The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 1439–1463, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, 3. ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA. p. 61, 2002.

THELLIN, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnol**, v.75, p. 197–200, 1999.

UNICA. União da Indústria de cana-de-açúcar. **Unicadata**. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br/index.php?idioma=1> >. Acesso em: 09 jan. 2014.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances Physiology Education**, v. 29, p. 151-159, 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, 2002.

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

XIE, Z. et al. Role of the stomatal development regulators FLP/MYB88 in abiotic stress responses. **The Plant Journal**, v. 64, p. 731-739, 2010.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **The Lancet**, v. 4, p.337-348, 2004.

YOO, W. G. et al. Reference genes for quantitative analysis on *Clonorchis sinensis* gene expression by real-time PCR. **Parasitology Research**, v. 104, p. 321–328, 2009.

ANEXO A - Dados climáticos

Temperatura do solo (°C)						Velocidade do vento (m.s ⁻¹)			
	5 cm	10 cm	20 cm	30 cm	60 cm	50 cm	2 m	10 m	
Média	29,7	29,6	29,5	29,4	29,5	Média	1	1,7	3,3
Min.	25,2	33,4	31,5	30,3	29,7	Max.	2,1	3,2	5,2
Max.	31,6	27	28	28,7	29,3	Min.	0	0	0,9
Temperatura do ar (°C)	Umidade Relativa (%)		Precipitação (mm)		Direção do vento (Graus)	Radiação Global (MJ.m ⁻² .dia ⁻¹)			
Média	25,2	Média	71,26	Soma	0,2	Média	3,3	20,761	
Max.	31,6	Max.	92,7						
Min.	21,2	Min.	38,81						

Anexo B – Dados fisiológicos

Genótipos	Tratamentos	Blocos	Repetições	A	g _s	E
RB72454	Controle	1	1	19,74145	0,077206	2,657683
RB72454	Controle	1	2	33,48276	0,15072	4,582614
RB72910	Controle	1	1	23,12796	0,090108	3,228752
RB72910	Controle	1	2	17,71277	0,070931	2,705111
RB72910	Controle	2	1	15,21309	0,060788	2,475012
RB72910	Controle	2	2	14,68791	0,058904	2,346941
RB72454	Controle	2	1	14,32164	0,05313	2,056444
RB72454	Controle	2	2	26,66543	0,109722	3,897765
RB72910	Controle	3	1	29,00877	0,132713	4,394867
RB72910	Controle	3	2	29,49718	0,142107	4,986093
RB72454	Controle	3	1	20,27411	0,077528	3,205343
RB72454	Controle	3	2	28,8636	0,130146	4,772621
RB72454	Controle	4	1	18,75598	0,073664	3,350963
RB72454	Controle	4	2	22,78291	0,09502	4,040439
RB72910	Controle	4	1	21,58889	0,088157	3,82294
RB72910	Controle	4	2	18,56218	0,079853	3,510359
RB72454	Estressado	1	1	4,605279	0,023121	1,16569
RB72454	Estressado	1	2	3,818301	0,017269	0,914164
RB72910	Estressado	1	1	12,19384	0,04194	1,970054
RB72910	Estressado	1	2	2,273154	0,009366	0,510183
RB72910	Estressado	2	1	3,857053	0,011876	0,634751
RB72910	Estressado	2	2	3,871925	0,010531	0,553129
RB72454	Estressado	2	1	5,077763	0,016015	0,80945
RB72454	Estressado	2	2	7,236923	0,024221	1,192033
RB72910	Estressado	3	1	7,215357	0,024914	1,24023
RB72910	Estressado	3	2	11,04083	0,03737	1,773384
RB72454	Estressado	3	1	3,391965	0,009839	0,507038
RB72454	Estressado	3	2	5,172427	0,016346	0,799195
RB72910	Estressado	4	1	14,02394	0,050131	2,312089
RB72910	Estressado	4	2	6,734053	0,021847	1,116739
RB72454	Estressado	4	1	5,476527	0,020672	1,047957
RB72454	Estressado	4	2	8,212847	0,030815	1,552063
RB72454	Controle	1	1	19,74145	0,077206	2,657683
RB72454	Controle	1	2	33,48276	0,15072	4,582614
RB72910	Controle	1	1	23,12796	0,090108	3,228752
RB72910	Controle	1	2	17,71277	0,070931	2,705111
RB72910	Controle	2	1	15,21309	0,060788	2,475012
RB72910	Controle	2	2	14,68791	0,058904	2,346941
RB72454	Controle	2	1	14,32164	0,05313	2,056444
RB72454	Controle	2	2	26,66543	0,109722	3,897765
RB72910	Controle	3	1	29,00877	0,132713	4,394867
RB72910	Controle	3	2	29,49718	0,142107	4,986093

Genótipos	Tratamentos	Blocos	Repetições	A	g _s	E
RB72454	Controle	3	1	20,27411	0,077528	3,205343
RB72454	Controle	3	2	28,8636	0,130146	4,772621
RB72454	Controle	4	1	18,75598	0,073664	3,350963
RB72454	Controle	4	2	22,78291	0,09502	4,040439
RB72910	Controle	4	1	21,58889	0,088157	3,82294
RB72910	Controle	4	2	18,56218	0,079853	3,510359
RB72454	Estressado	1	1	4,605279	0,023121	1,16569
RB72454	Estressado	1	2	3,818301	0,017269	0,914164
RB72910	Estressado	1	1	12,19384	0,04194	1,970054
RB72910	Estressado	1	2	2,273154	0,009366	0,510183
RB72910	Estressado	2	1	3,857053	0,011876	0,634751
RB72910	Estressado	2	2	3,871925	0,010531	0,553129
RB72454	Estressado	2	1	5,077763	0,016015	0,80945
RB72454	Estressado	2	2	7,236923	0,024221	1,192033
RB72910	Estressado	3	1	7,215357	0,024914	1,24023
RB72910	Estressado	3	2	11,04083	0,03737	1,773384
RB72454	Estressado	3	1	3,391965	0,009839	0,507038
RB72454	Estressado	3	2	5,172427	0,016346	0,799195
RB72910	Estressado	4	1	14,02394	0,050131	2,312089
RB72910	Estressado	4	2	6,734053	0,021847	1,116739
RB72454	Estressado	4	1	5,476527	0,020672	1,047957
RB72454	Estressado	4	2	8,212847	0,030815	1,552063