

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DA AQUAPORINA ScPIP2;1
EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR
CONTRASTANTES PARA A TOLERÂNCIA À SECA**

Luis Tadeu Marques Frigel

Biólogo

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Junho de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DA AQUAPORINA ScPIP2;1
EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR
CONTRASTANTES PARA A TOLERÂNCIA À SECA**

Luis Tadeu Marques Frigel

Orientador: Prof. Dr. Dilermando Perecin

Co-Orientadora: Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Agronomia (Genética e
Melhoramento de Plantas).

Jaboticabal - SP

Junho de 2011

F912e Frigel, Luis Tadeu Marques
Expressão diferencial da aquaporina ScPIP2;1 em genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para a tolerância à seca / Luis Tadeu Marques Frigel. – Jaboticabal, 2011.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.

Orientador: Dilermando Perecin

Banca examinadora: Janete Aparecida Desiderio, Michael dos Santos Brito.

Bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Melhoramento genético.

I. Título. Expressão diferencial da aquaporina ScPIP2;1 em genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para a tolerância à seca

II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61:631.52

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Certificado de Aprovação

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Luis Tadeu Marques Frigel - Nascido a 05 de março de 1987, natural de Cravinhos, estado de São Paulo, é formado em Biologia no ano de 2008, pelo Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto, estado de São Paulo. Atualmente inscrito no Conselho Regional de Biologia (CRBio-1) 1ª Região sob o nº 24342. Em janeiro de 2008 foi estagiário e em março do mesmo ano ingressou no projeto de Iniciação Científica, pelo Instituto Agrônomo de Campinas IAC – Centro de Cana, Ribeirão Preto, com orientação do Dr. Vicente Eugênio de Rosa Jr. (*in memoriam*). Em março de 2009 ingressou no curso de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), ao nível de Mestrado, na Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp – Câmpus de Jaboticabal – SP.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente,
mas o que melhor se adapta às mudanças”

Charles Darwin

Dedico

Aos meus queridos pais, base forte para minha vida e responsáveis pela formação do meu caráter e da minha persistência, pelo trabalho e luta em minha criação, formação profissional e apoio incondicional durante toda minha trajetória científica.

Aos meus irmãos por estarem sempre presentes em todos os momentos de minha vida.

Aos meus avôs por completarem a minha formação pessoal e profissional. Ao meu avô Geraldo (*in memoriam*), exemplo de dignidade, honestidade, sinceridade e de caráter estimável. À minha avó Maria, mulher de fibra e muito amorosa, que traz consigo o sentimento de amor ao próximo.

Ao idealizador deste trabalho Dr. Vicente de Rosa (*in memoriam*) que sonhou ver este trabalho concretizado.

Ofereço

A Deus, que foi durante todo tempo minha luz e me guiou por toda existência e durante a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Dilermando Perecin, pela orientação e disponibilidade em me ajudar.

À Dra. Silvana Creste pela co-orientação e pela aprendizagem que me proporcionou.

À Dra. Paula Nóbile pela co-participação, fundamental para a finalização deste trabalho.

Ao amigo e parceiro de pós-graduação João Felipe Nebó pelas incansáveis orientações e dicas durante o trabalho.

Ao Laboratório de Biotecnologia de cana-de-açúcar, do Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC - Ribeirão Preto – SP) pela permissão, colaboração e estímulo.

Ao Dr. Marcos Andrade Guimarães Landell por sua dedicação ao melhoramento genético de cana-de-açúcar, apoio, incentivo e por disponibilizar o material vegetal utilizado na realização deste trabalho.

À toda a minha família pelo apoio e compreensão.

À minha namorada Glauciane, pelo amor, carinho, paciência e cumplicidade.

Às amigas do laboratório, Camila, Thais, Viviane, Flávia, Carol, Débora, Cibele Nataliane (Natty), Leticia, Natália, Priscila, Isabelle, Bruna, Fernanda e Paula que estiveram presentes em todos os momentos. Também aos amigos inesquecíveis, Juliano, Luizinho, Maicon Volpin, Michael Brito, Alexandre (“Pensa”), Lecine, Alex, Laurence, Lucas (Lucão), Bruno (Brunão), Jonathan (Jhon) obrigado pela amizade e paciência de todos.

Aos amigos conquistados no IAC, Dona Zoé (“Zoéti”), Dona Marta, Sr. “Bola”, Alzira (Zira), Dona Terezinha, Batoré, Sr. Vicente, Dona Vicentina, Sueli, Maria

Augusta, Jurema, Daniel, Dr. Ivan, Dr. Mauro Xavier, Dr. Maximiliano (Max), Dr. Julio (Julhão), Dra. Luciana Rossini Pinto, Dra. Luciana Souza, obrigado pela amizade e conselhos.

A todos os colaboradores do CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura) USP-ESALQ Piracicaba – SP, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Finalmente, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram não somente para a realização deste trabalho, como também para o meu aprimoramento profissional.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vii
Resumo.....	ix
Summary.....	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A cana-de-açúcar (<i>Saccharum spp.</i>).....	3
2.2 Estresses abióticos	4
2.2.1 Fuga.....	5
2.2.2 Tolerância.....	5
2.3 Mecanismos de percepção de sinais e alterações moleculares provocadas pelo estresse hídrico nas plantas.....	7
2.4 Aquaporinas e seu papel no transporte de água transmembrana nos vegetais.....	10
2.5 Polietilenoglicol (PEG): um fator de simulação de estresse hídrico <i>in-vitro</i>	14
2.6 Genes de referência (<i>housekeeping genes</i>).....	15
OBJETIVOS.....	16

III. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Material vegetal.....	17
3.2 Experimentação com Polietilenoglicol (6000).....	17
3.3 Experimentação em campo.....	17
3.4 Maceração do material vegetal.....	18
3.5 Extração de RNA total com Trizol Reagent (Invitrogen).....	18
3.6 Avaliação da qualidade e quantidade do RNA total.....	19
3.7 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	19
3.8 Busca em banco de dados por homólogos à aquaporinas.....	19
3.9 Multialinhamento e filogenia.....	19
3.10 Perfil de expressão diferencial das aquaporinas pela análise <i>in silico</i> (<i>Northen Blot Virtual</i>).....	20
3.11 Desenho dos <i>primers</i>	20
3.12 Seleção do gene de referência.....	20
3.13 Análise da expressão gênica da aquaporina ScPIP2;1.....	20
IV. RESULTADOS.....	21
4.1 Avaliação de candidatos a genes de referência (<i>housekeeping</i> genes).....	21
4.2 Imposição do estresse osmótico induzido por PEG (Polietilenoglicol) 15% em cultivo <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar.....	22
4.3 Busca por sequências homólogas de aquaporinas, análise filogenética e perfil de expressão <i>in silico</i>	23

4.4 Expressão gênica da Aquaporina <i>ScPIP2</i> nos genótipos avaliados em experimentação com PEG <i>in vitro</i>	30
4.5 Diferenças no perfil de expressão gênica de Aquaporina <i>ScPIP2;1</i> nos genótipos IACSP94-2094 e IACSP97-7065 em tratamento <i>in vitro</i>	31
4.6 Comparação do perfil da expressão gênica <i>ScPIP2;1</i> nos genótipos IACSP94-2094 e IACSP97-7065 em avaliação de campo.....	32
V. DISCUSSÃO.....	34
VI. CONCLUSÕES.....	38
VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

Lista de Tabelas**Página**

Tabela 1. Perfil de expressão diferencial pela análise <i>in silico</i> das SAS de cana-de-açúcar entre as bibliotecas do SUCEST. Valores da tabela representam a abundância relativa das SAS (número de <i>reads</i> das bibliotecas por 10.000 clones sequenciados no projeto SUCEST).....	29
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** - Mecanismo de resposta ao estresse, mediado por seca ou frio em plantas.....8
- Figura 2** - Via de sinalização ABA-dependente (I e II) durante a percepção do estresse de seca e salinidade.(adaptado de SHINOZAKI E YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997).....10
- Figura 3** - Representação esquemática da estrutura protéica dos canais aquaporinas no estado fechado (defosforilado) devido aos estresses de seca e inundação. O canal aberto (fosforilado) em condições normais. (Fonte - TORNROTH-HORSEFIELD et al., 2006).....12
- Figura 4** - Perfil de expressão gênica para os genes de referência GAPDH (Gliceraldeido-fosfato-desidrogenase), ACT (Actina), UBQ (Ubiquitina2) e RPL (*ribosomal protein-like 354*), em experimento com cana-de-açúcar submetida ao cultivo *in vitro* com polietilenoglicol 15% avaliado pelo programa NORMfinder.....22
- Figura 5** - Plantas cultivadas *in vitro* apresentando resposta ao estresse osmótico mediado por PEG 15% nos tratamentos 72 e 120 horas nos genótipos, (A) tolerante IACSP94-2094 e (B) sensível IACSP97-7065, evidenciando a oxidação do meio de cultura, círculo vermelho.....23
- Figura 6** - Árvore filogenética (dendrograma) das sequências de nucleotídeo de cana-de-açúcar (SAS, *Sugarcane Assembled Sequences*), mostrando quatro classes de aquaporinas. Os números nos ramos representam acurácia (%) obtida por “bootstrap”.....25
- Figura 7** - Árvore filogenética (dendrograma) das sequências de proteína de PIP2 descritos na literatura de arroz (*Os*), milho (*Zm*), *Arabidopsis* (*At*) e as SAS de cana (*Sc*), todas traduzidas em proteínas completas, em quatro subdivisões (1 a

4). Os números nos ramos representam acurácia (%) obtida por “bootstrap”.....	27
Figura 8 - Perfil de expressão de <i>ScPIP2;1</i> no genótipo tolerante IACSP94-2094 (A) e no genótipo sensível IACSP97-7065 (B) , expostos ao tratamento com PEG 15% após 24h, 48h, 72h e 120h. No eixo vertical é apresentada a quantificação relativa das amostras comparadas ao controle 0h.....	31
Figura 9 - Perfil de expressão relativa de <i>ScPIP2;1</i> nos genótipo tolerante IACSP94-2094 e sensível IACSP97-7065, expostos ao PEG 15% após 24h, 48h, 72h e 120h. No eixo vertical é apresentada a quantificação relativa das amostras comparadas ao controle 0h, em escala logarítmica (LOG).....	33
Figura 10 - Perfil de expressão relativa de <i>ScPIP2;1</i> nos genótipo tolerante IACSP94-2094 e sensível IACSP97-7065, submetidos ao déficit hídrico em condições de campo durante 30, 90 e 120 dias de seca. No eixo vertical é apresentada a quantificação relativa das amostras comparadas ao controle 0h.....	35

Lista de Abreviaturas

ABA: ácido abscísico

AQP: aquaporinas

At: *Arabidopsis thaliana*

BLAST: (*Basic Local Alignment Search Tool*)

cDNA: DNA complementar

CL: calo estresse térmico

CO: colmo

Drivers: iscas

GAPDH: gliceraldeído-fosfato-desidrogenase

IAC: Instituto Agrônômico de Campinas

LB: gemas laterais adultos em casa de vegetação

LR: folha enrolada planta adulta de campo

LV: folhas plântulas estioladas

MIP: proteína intrínseca maior

MR: meristema

NCBI: *national center for biotechnology information*

NIP/NOD: proteínas intrínsecas *nodulin 26-like*

Os: *Oryza sativa*

PEG: polietilenoglicol

PIP: proteína intrínseca da membrana plasmática

PL: plântula inoculada

qPCR: *quantitative polimerase chain reaction*

reads: identificação de sequencias

RPL354: *ribossomal protein like 354*

RT: zona de transição raiz/tronco

RZ: raiz

SAS: *Sugarcane Assembled Sequences*

Sc: sugarcane

SE: semente

SIP: pequena proteína intrínseca básica

SUCEST: *sugarcane EST Project*

TIP: proteína intrínseca do tonoplasto

Tm: temperatura de dissociação *melting*

TR: tecido reprodutivo

UBQ2: ubiquitina 2

Zm: *Zea mays*

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE AQUAPORINAS ScPIP2;1 EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR CONTRASTANTES PARA A TOLERÂNCIA À SECA

RESUMO - As aquaporinas (AQP) são proteínas canais de água importantes e correlacionados a tolerância de plantas à seca. A busca por sequências homólogas de AQP junto ao banco de dados SUCEST (*sugarcane EST Project*) identificou 33 SAS (*sugarcane assembled sequences*), pertencentes a quatro classes, sendo a PIP (proteína intrínseca da membrana plasmática) subdividida em PIP1 e PIP2. A análise de expressão gênica para ScPIP2;1 em ensaios de estresse ao déficit hídrico *in vitro* e a campo demonstrou diferentes padrões de expressão para os genótipos IACSP94-2094 (tolerante) e IACSP97-7065 (sensível). No ensaio *in vitro* foi identificado no genótipo tolerante maior expressão em 48h após o déficit hídrico pelo tratamento com polietilenoglicol 15% (PEG). No sensível a expressão aumentou gradativamente sendo em 72h e 120h o maior nível de expressão após o déficit hídrico. O genótipo sensível apresentou elevado número de transcritos para ScPIP2;1. Os resultados demonstram que o genótipo sensível tanto a campo como *in vitro* expressa mais ScPIP2;1 que o tolerante, sendo este gene um candidato importante para o melhoramento genético de cana na identificação de genótipos superiores em relação à seca.

Palavras chave: aquaporina ScPIP2;1, estresse hídrico, expressão gênica, polietilenoglicol, *Saccharum spp*

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF AQUAPORIN ScPIP2;1 IN SUGARCANE GENOTYPES OF CONTRASTING FOR DROUGHT TOLERANCE

SUMMARY - Aquaporins (AQP) are important water channels proteins correlated to drought tolerance in plants. The search for sequences homologous to AQPs in SUCEST (sugarcane EST Project) database identified 33 SAS (sugarcane assembled sequences) from four classes, one of them being PIP (*plasma membrane intrinsic protein*), which is divided into two subgroups, PIP1 and PIP2. The analysis of gene expression for ScPIP2;1 *in vitro* and in field trails showed different expression patterns in genotypes IACSP94-2094 (tolerant) and IACSP97-7065 (sensitive). For the *in vitro* experiment, increased expression of ScPIP2;1 was observed for the tolerant genotype after 48 hours exposure to 15% polyethylene glycol (PEG) . The ScPIP2;1 transcript level for the sensitive genotype showed gradual increases after 72 and 120h exposure to PEG. The results indicate a higher expression of ScPIP2;1 in the sensitive genotype compared to the tolerant for both field and *in vitro* experiments, and this gene seems to be an important candidate for the identification of superior genotypes for sugarcane genetic breeding aiming drought tolerance.

Key words: aquaporin ScPIP2;1, gene expression, polyethylene glycol, *Sacharum* spp, water stress

I. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) apresenta-se como uma cultura altamente eficiente para a obtenção de açúcar e álcool. O Brasil se destaca no cenário mundial sendo líder em produtividade.

Atualmente, a busca por genótipos tolerantes à seca tem sido um dos principais alvos dos programas de melhoramento, em função da expansão da cultura para regiões de cerrado. Nessas regiões, a deficiência hídrica (estresse hídrico ou seca) é um dos principais fatores limitantes para o crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar, causando alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas e conseqüentemente, comprometendo a produtividade (RAMESH, 2000). Neste sentido, o entendimento e a caracterização de genes que possam ser relacionados à tolerância à seca em cana-de-açúcar tem sido alvo dos programas de melhoramento de cana no Brasil e no mundo.

A tolerância à seca é uma característica complexa, que envolve a expressão de vários genes que podem contribuir direta ou indiretamente na manifestação de um fenótipo tolerante (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997; PAPINI-TERZI et al., 2005; GUPTA et al., 2010). Entre os que atuam diretamente, estão aqueles que expressão as proteínas funcionais aquaporinas, as quais compreendem uma grande família de canais de membrana que facilitam a permeação de água e pequenos solutos neutros (AGRE, 1998; LI et al., 2008). Normalmente há um grande número de membros desta família em plantas superiores que exibem diversas funções fisiológicas e são reguladas em um tempo específico de modo particular (LI et al., 2008). De acordo com a localização e características estruturais, em monocotiledôneas as aquaporinas são classificadas em quatro subfamílias: proteínas intrínsecas da membrana plasmática (PIP), proteínas intrínsecas do tonoplasto (TIP), proteínas intrínsecas *nodulin 26-like* (NIP), proteínas intrínsecas de pequena base (SIP), conforme

JOHANSON et al. (2001); CHAUMONTE et al. (2001); SAKURAI et al. (2005); DANIELSON & JOHANSON (2008). As PIPs ainda são classificadas em subgrupos, PIP1 e PIP2 com base em similaridade de sequências (ALEXANDERSSON et al., 2005), sendo encontradas em *Arabidopsis thaliana* 13 diferentes isoformas (MAUREL et al., 2008).

Diversos estudos com diferentes vegetais têm confirmado que as aquaporinas estão intimamente relacionadas a diversos processos fisiológicos na planta, entre eles a osmorregulação, assimilação de CO₂, fechamento e abertura estomática e absorção de elementos minerais (LI et al., 2008; GUPTA et al., 2010). Além disso, seca e salinidade podem alterar significativamente os padrões de expressão de aquaporinas PIP (HEINEN et al., 2009). Em cana-de-açúcar, pouco ou nada se sabe sobre a relação entre aquaporinas (ScPIP2;1) e a tolerância à seca. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar os níveis de transcritos da aquaporina ScPIP2;1 em dois genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para tolerância à seca.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)

A cana-de-açúcar é uma gramínea pertencente à família *Poaceae*, tribo *Andropogoneae* e gênero *Saccharum*, caracterizado por um alto nível de ploidia e frequente aneuploidia. O gênero *Saccharum* inclui seis espécies: *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. spontaneum*, *S. barberi*, *S. sinense* e *S. edule*. Os clones de *S. officinarum* ($2n = 80$), espécie domesticada, são conhecidos também como canas nobres por serem adocicadas. As espécies *S. robustum* ($2n = 60-80$) e *S. spontaneum* ($2n = 40-128$) são consideradas espécies selvagens. *S. barberi* ($2n = 81-124$) e *S. sinense* ($2n = 111-120$) são conhecidas como canas da China e Índia, respectivamente, tendo contribuído com poucos genes para os genótipos atuais. Provavelmente, estas duas últimas derivaram de hibridizações naturais entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*. *S. edule* ($2n = 60, 70, 80$) mas sem contribuição para os genótipos atuais DANIELS et al. (1975). Os genótipos de cana-de-açúcar hoje cultivados em escala comercial são derivadas de hibridizações interespecíficas entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, apresentando alogamia e alta heterozigosidade e, em geral, não toleram a endogamia HOARAU et al. (2007).

As seis espécies de *Saccharum* juntamente com os gêneros *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* e *Sclerostachya* constituem um grupo de intercruzamento conhecido como Complexo *Saccharum*, o qual representa a variabilidade genética para o melhoramento da cana-de-açúcar DANIELS et al. (1975).

O cultivo da cana-de-açúcar está presente em mais de 90 países FAO (2008) e o Brasil se destaca como maior produtor mundial, chegando na região

Centro-Sul à produtividade de 556,7 milhões de toneladas, na safra 2010/2011 UNICA (2011) Além da produção de açúcar, a indústria canavieira brasileira mantém o maior sistema de produção de energia comercial de biomassa no mundo, através do etanol e do uso, quase total, do bagaço. Além de movimentar cerca de R\$ 36 bilhões/ano e gerar mais de um milhão de empregos diretos e indiretos. Assim, o agronegócio em cana-de-açúcar representa aproximadamente 3,5% do PIB (Produto Interno Bruto) nacional (UNICA, 2011).

Em contrapartida, estresses abióticos como deficiência hídrica podem provocar quedas significativas não só na produção agrícola de cana, mas, também, em outras culturas. Hoje a seca pode afetar a cultura da cana-de-açúcar mesmo nas estações chuvosas, em decorrência de veranicos. Por isso, o entendimento dos mecanismos adotados pela planta para tolerar a escassez de água é de grande importância, não somente para o desenvolvimento de genótipos tolerantes à seca, mas, também, por proporcionar a sustentabilidade e viabilidade econômica dessa cultura.

2.2 Estresses abióticos

Os estresses abióticos, de maneira geral, se referem a um desvio das condições ótimas para a vida (nas plantas e animais) levando a mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais podem ser reversíveis a princípio, mas que podem se tornar permanentes dependendo do grau de estresse (LARCHER, 2004).

Em condições naturais e agricultáveis, as plantas estão frequentemente expostas às condições de múltiplos estresses, tais como a seca, a elevada salinidade, as altas temperaturas, as inundações e a intensa luminosidade (CHEN & MURATA, 2002; RIZHSKY et al., 2004). Estes estresses, por sua vez,

desempenham um papel importante na determinação de como o solo e o clima limitam a distribuição de espécies vegetais às mais variadas regiões (BRESSAN, 2004; VERSLUES et al., 2006).

O déficit hídrico (seca) é um importante fator limitante para o crescimento, desenvolvimento e produtividade das mais variadas culturas agrícolas. Para as plantas, seca significa perda hídrica decorrente de temperaturas elevadas, causando a diminuição das células (perda de turgor), mudanças no potencial de membrana e desintegração dos processos metabólicos (MAHAJAN & TUTEJA, 2006). A diminuição do potencial hídrico do solo pode interferir diretamente na eficiência do uso da água pelas plantas, as quais necessitam desenvolver um mecanismo para tornar o potencial hídrico intracelular mais negativo que o do solo, de modo a manter um gradiente de potencial hídrico entre o solo e a planta (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Nos vegetais, os mecanismos que conduzem a tolerância à seca podem ser divididos em dois grupos principais:

2.2.1 Fuga: mecanismo pelo qual a planta evita a falta de água nos tecidos durante a seca por meio da manutenção do turgor e volume celular, tanto pela absorção de água por um sistema radicular abundante ou pela redução da sua perda através da transpiração por vias não estomáticas como a cutícula da folha (SANCHEZ et al., 2002; VERSLUES et al., 2006).

2.2.2 Tolerância: mecanismo que permite à planta manter o metabolismo, mesmo sob baixos potenciais de água no solo, devido principalmente ao ajuste osmótico (AO) e à capacidade antioxidante. O AO resulta do acúmulo de solutos compatíveis ou osmólitos intracelulares que reduzem o potencial osmótico auxiliando na manutenção do turgor. O AO é considerado uma característica importante que contribui para reduzir os efeitos da seca sobre a produtividade em diversas culturas (MORGAN et al., 1991; MOUSTAFA et al., 1996). Por sua vez, a capacidade antioxidante resulta da habilidade das plantas de eliminar moléculas reativas a oxigênio (ROS – como o peróxido de hidrogênio, os radicais hidroxilas e

os ânions superóxidos), os quais causam injúrias celulares como peroxidação de lipídeos e/ou proteínas e modificações em ácidos nucleicos (SANCHEZ et al., 2002). A eliminação de ROS é realizada por compostos antioxidantes, como ácido ascórbico, a glutathiona, os carotenóides e por enzimas responsáveis pelo metabolismo de ROS (i.e. superoxidase dismutase, glutathiona peroxidase, catalase e tioredoxina). Em plantas sob estresse hídrico, observa-se um aumento na atividade das enzimas detoxificadoras de ROS, sendo que esse aumento está relacionado ao aumento na tolerância à seca (XIONG & ZHU, 2002).

Adaptações durante o estresse hídrico resultam de eventos moleculares complexos interligados formando um conjunto de redes de percepção e sinalização, os quais ativam mecanismos para restabelecimento da homeostase, proteção e reparo de moléculas essenciais (RAMANJULU & BARTELS, 2002).

Em cana-de-açúcar o déficit hídrico é um dos estresses mais danosos para a planta, causando elevado decréscimo de produtividade, principalmente durante os primeiros estágios de desenvolvimento (60-90 dias), onde a seca pode interferir, principalmente, nas fases de perfilhamento e crescimento, períodos estes que necessitam de maior disponibilidade hídrica, pois, nesta etapa se estabelece, aproximadamente, de 70 a 80% da produção (RAMESH, 2000).

Na busca pelo melhor entendimento dos processos moleculares ocorridos durante a seca, a utilização de ferramentas moleculares como expressão gênica via qPCR tempo real, macro e microarranjos, apresenta-se de suma importância, podendo auxiliar na avaliação do perfil de expressão de genes envolvidos na resposta à seca, e proporcionar métodos futuros de seleção de genótipos tolerantes à seca a nível molecular nos programas de melhoramento, por meio de experimentação *in vitro* e a campo.

2.3 Mecanismos de percepção de sinais e alterações moleculares provocadas pelo estresse hídrico nas plantas

Em plantas, a percepção do estresse abiótico de seca e frio, processa-se através de receptores de membrana (proteínas histidinas quinase) em decorrência da baixa osmolaridade intracelular, desencadeando a transdução de sinais para a expressão de genes envolvidos com a produção de proteínas. Estas proteínas podem ser divididas em dois grupos: as proteínas funcionais e os fatores de transcrição. No primeiro grupo estão as proteínas que de fato geram o efeito de tolerância ao estresse, sendo elas: proteínas canais de água (aquaporinas), desidrinas, proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*), chaperonas, enzimas de detoxificação, enzimas “chaves” para a biossíntese de osmólitos (prolina, betaina, trehalose e antioxidantes). No segundo grupo, estão os fatores de transcrição MYB, MYC, bZIP, CBF 1,2,3, além das proteínas regulatórias Kinases (MARPK, MARPKK) e intensificadores de sinais como a Fosfolipase C (Figura 1). Os fatores de transcrição são responsáveis pela regulação de outros genes e por isso irão controlar a transdução de sinais em genes alvo (BECK et al., 2007). A ativação destes mecanismos durante uma condição de estresse contribui para a resposta de tolerância por frio ou por seca.

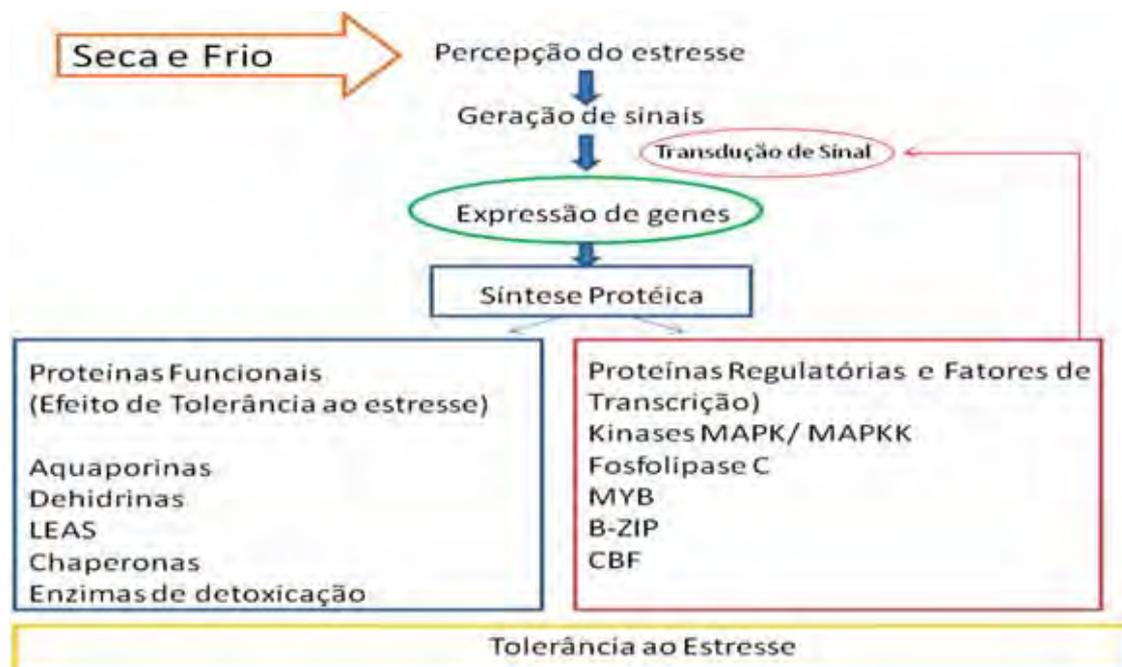


Figura 1. Mecanismo de resposta ao estresse, mediado por seca ou frio em plantas. (adaptado de BECK et al., 2007).

O processo de transmissão do sinal inicia-se durante o estado de privação hídrica quando as proteínas histidina kinase e as fosfatases, localizadas na membrana celular, são ativadas pelo aumento da osmolaridade intracelular e sequencialmente ativação de uma cadeia de sinais (BECK et al., 2007). Inicialmente ocorre ativação do receptor da enzima fosfolipase C (PLC), que hidrolisa fosfatidilinositol 4,5- bifosfato em Inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3) e diacilglicerol (MAHAJAN & TUTEJA, 2006). O InsP3 apresenta importante função na via, atuando nos sensores de cálcio (proteína *Calcineurim B-like*, CLB) para a liberação deste íon que irá estimular proteínas kinases e fosfatases. O cálcio é um importante sinalizador para a transdução de sinal durante a seca e frio, possibilitando a ativação de fatores de transcrição DREBs e CBFs (BECK et al., 2007).

Os genes induzidos pela deficiência hídrica estudados até hoje, na sua maioria também foram induzidos por ABA (Ácido Abscísico), o que torna este fitohormônio, mensageiro principal na mediação entre o sinal ambiental indutivo (seca, frio e salinidade) e as respostas moleculares, fisiológicas e morfológicas. SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI (1997) ainda citam que genes induzidos por deficiência hídrica podem ser ativados por duas rotas de percepção, sendo uma ABA-dependente e outra ABA-independente.

A via ABA dependente ainda pode ser dividida em duas, sendo que na primeira (I) são ativados os fatores de transcrição MYC / MYB e b-ZIP não requerendo ligação ao motivo ABRE (*ABA-responsive element*) (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997). Já na segunda via (II) é ativado o fator de transcrição b-ZIP. Este apresenta resposta direta com a ativação da região promotora ABRE (PyACGTGGC) que está ligada a ativação da seqüência *cis* de DNA para regulação da expressão de genes em resposta ao estresse (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997; PAPINI-TERZI et al., 2005; GUPTA et al., 2010) (Figura 2). A via denominada ABA-independente não requer a sinalização deste fitohormônio, pois a própria geração de sinais intracelulares durante o estresse é que irá desencadear a síntese de reguladores.



Figura 2. Via de sinalização ABA-dependente (I e II) durante a percepção do estresse de seca e salinidade. (adaptado de SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997).

2.4 Aquaporinas e seu papel no transporte de água transmembrana nos vegetais

O crescimento e o desenvolvimento dos vegetais são dependentes essencialmente de processos fisiológicos que ocorrem nas folhas, tais como fotossíntese e transpiração. Para funcionar adequadamente, as folhas devem manter um teor de água equilibrada, especialmente durante a evapotranspiração, processo no qual a água é inevitavelmente perdida pela superfície foliar e assim ocorre a absorção de CO₂ para a síntese de fotoassimilados (HEINEN et al., 2009). Neste processo, a água é perdida para a atmosfera e, por isso, as plantas

necessitam de disponibilidade hídrica no solo para manter este fluxo e gerar compostos energéticos. Antes de ser evaporada pelos estômatos, grande quantidade de água é transportada (transporte de longa distância) das raízes/solo para as folhas passando por diversas camadas de células e diferentes tecidos (HEINEN et al., 2009). A água absorvida pela raiz pode seguir trajetos diferentes, movendo-se através da parede celular (apoplasto) ou de célula para célula (simplasto) (STEUDLE, 1994; STEUDLE & PETERSON, 1998). Devido à sua baixa resistência ao fluxo de água, acredita-se que o caminho apoplástico possa ser o principal durante a transpiração (SACK & HOLBROOK, 2006).

Além do fluxo radial de água para todas as células da planta, controlado pela evapotranspiração, o movimento de água através das membranas celulares também é importante para a omeostase, aumentando o volume celular e a manutenção do turgor durante a expansão e regulação da abertura e fechamento dos estômatos. A movimentação da água através das membranas celulares é facilitada por canais de água denominados aquaporinas (AQPs) (AGRE et al., 1998). As AQPs também transportam uma grande variedade de solutos não-polares, como uréia ou glicerol, dióxido de carbono, amônia, espécies reativas de oxigênio (ROS) peróxido de hidrogênio, e os metalóides antimoniato, arsenito e silício (BIENERT et al., 2008; MAUREL et al., 2008).

A capacidade das AQPs transportarem água através da membrana pode ser regulada, principalmente, pelo seu estado de fosforilação. As células podem regular a sua permeabilidade à água ao acrescentarem ou removerem grupos fosfato a resíduos de aminoácidos específicos (TORNROTH-HORSEFIELD et al., 2006). Esta modulação de atividade pode alterar a taxa de movimento da água através da membrana (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Sob condições normais, a aquaporina é fosforilada (indicado por P, (Figura 3) ficando o canal de água aberto. Durante a seca fecha-se o canal (aquaporinas) em resposta à remoção de grupos fosfato a partir de dois resíduos de serina conservada. Durante a inundação também ocorre o fechamento dos canais

aquaporinas em resposta à protonação de uma histidina conservada (indicado por H +) TORNROTH-HORSEFIELD et al. (2006) (Figura 3).

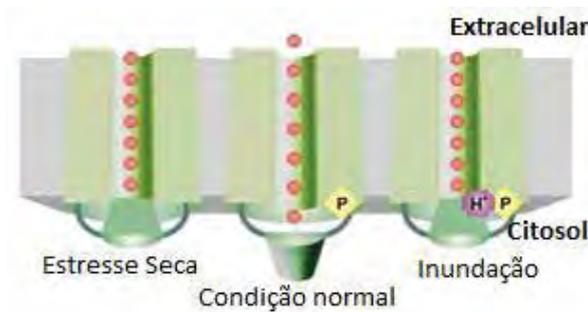


Figura 3. Representação esquemática da estrutura proteica dos canais aquaporinas no estado fechado (desfosforilado) devido aos estresses de seca e inundação. O canal aberto (fosforilado) em condições normais. (Fonte - TORNROTH-HORSEFIELD et al., 2006).

A descrição geral de aquaporinas se resume a pequenas proteínas integrais de membrana distribuídas em praticamente todos os seres vivos (animais, microorganismos e plantas), mas particularmente abundantes em plantas superiores.

Nas plantas existe uma grande quantidade de isoformas de aquaporinas sendo 35 homólogos em arábida e 33 em arroz (MAUREL et al., 2008). Além disso, as características estruturais das AQPs são muito conservadas entre animais, microorganismos e plantas. Com base nas similaridades de sequência de DNA, localização celular e peso molecular que pode variar entre 23 e 31 kDa, elas são classificadas em quatro diferentes subfamílias em monocotiledôneas, sendo elas: PIPs (proteínas intrínsecas da membrana plasmática), TIPs (proteínas intrínsecas do tonoplasto), as NIP-NODs (nodulin26-like proteínas intrínsecas) que foram identificadas em raízes de soja (*Glycine Max*) e na membrana de bactérias fixadoras de N_2 , SIPs (pequenas proteínas intrínsecas básicas), e, mais recentemente, uma quinta subfamília descrita em dicotiledôneas, XIPs (proteínas

intrínsecas X) (CHAUMONT et al., 2001; JOHANSON et al., 2001; SAKURAI et al., 2005; DANIELSON & JOHANSON, 2008). A subfamília PIP ainda apresenta-se subdividida em dois subgrupos, sendo, PIP1 e PIP2 (MAUREL et al., 1997; JOHANSSON et al., 1998).

Embora o transporte de água através de poros na membrana tenha sido proposto anteriormente (DAINTY & GINZBURG, 1963; FINKELSTEIN, 1987), a descoberta da estrutura molecular de AQPs e estudos detalhados de sua função revolucionaram os estudos sobre as relações hídricas nas plantas, conforme STEUDLE & HENZLER (1995); MAUREL (1997); KJELLBOM et al. (1999); TYERMAN et al. (1999); STEUDLE (2001). Há crescentes evidências de que AQPs sejam responsáveis por até 95% da permeabilidade à água da membrana plasmática, conforme HENZLER & STEUDLE (2004); HEINEN et al. (2009). Em geral, existem três maneiras pelas quais a troca da água através da membrana celular é regulada via AQPs: nível de expressão, ou seja, abundância AQP; a distribuição após a síntese: as AQPs se deslocam para diferentes partes da célula; a abertura do canal, ou estado aberto / fechado (HEINEN et al., 2009).

Estudos de expressão gênica demonstraram que, em condições normais, as AQP desempenham um papel muito importante nas raízes. De fato, muitos homólogos de PIP e TIP foram estudados e revelaram níveis mais altos de expressão nas raízes do que em folhas, conforme JOHANSSON et al. (1996); BIELA et al. (1999); CHAUMONT et al. (2000); BAIGES et al. (2001); SMART et al. (2001); ZHANG et al. (2008). Um exemplo pode ser visto em milho (*Zea mays*), onde, *ZmPIP1; 1*, *ZmPIP1; 2*, e *ZmPIP2; 5* apresentaram níveis de transcrição maiores nas raízes em relação às folhas (CHAUMONT et al., 2000). No entanto, outros estudos apresentaram AQPs expressas em folhas em quantidades semelhantes as das raízes, mais abundante, ou exclusivas de folhas. A recente caracterização das PIPs em tulipas (*Tulipa gesneriana*) mostraram que *TgPIP2; 1* e *TgPIP2; 2* são altamente expressas em folhas (AZAD et al., 2008). Em *Arabidopsis thaliana* os níveis de *AtPIP2; 6* foi maior na parte aérea que nas raízes. Em arroz (*Oryza sativa*), a expressão da maioria dos genes AQP

apresentou especificidade de expressão de acordo com o órgão avaliado. Isso demonstra que os níveis de expressão de AQPs podem variar de acordo com o órgão da planta a ser avaliado, sendo raízes e folhas os órgãos mais bem caracterizados, demonstrando a importância da AQPs não só nas relações hídricas de raízes, mas também na fisiologia e no desenvolvimento de folhas (HEINEN et al., 2009).

No entanto, mesmo com tantas informações sobre o papel das aquaporinas em relação ao estresse hídrico (seca) em diversos vegetais, pouco ou nada se sabe sobre seu papel nas relações hídricas em cana-de-açúcar.

2.5 Polietilenoglicol (PEG): um fator de simulação de estresse hídrico *in-vitro*

A tolerância à seca é um mecanismo complexo, com expressão de vários genes que influenciam direta ou indiretamente na manifestação de um fenótipo tolerante. Uma consideração muito importante em estudos de expressão gênica, diz respeito a identificação de quais genes são realmente induzidos pelo estresse e quais são decorrentes das injúrias causadas pelo estresse. As avaliações de campo podem mascarar a identificação de genes de resposta à seca, visto que são diversos os fatores ambientais que podem interferir direta ou indiretamente na expressão do fenótipo. Nesse sentido, avaliações altamente controladas, em casa de vegetação ou em experimentações *in-vitro* são de suma importância, pois, permitem um maior controle experimental (ROY et al., 2009).

Em 1961, foi demonstrado que o polietilenoglicol (PEG) pode ser usado para modificar o potencial osmótico de soluções nutritivas em meios de cultura em plantas, e assim, induzi-las a um déficit hídrico de forma relativamente controlada, apropriada para protocolos experimentais em laboratórios (LAGERWERFF et al., 1961). Foi identificado a partir de então que o PEG, devido seu tamanho e peso

molecular não penetra nas células do vegetal em experimentação. Desde então este composto passou a ser utilizado como um método ideal em experimentos de hidroponia. Durante a década de 70 e 80 o PEG de peso molecular entre 4000 m/w e 8000 m/w foi comumente utilizado em diversos experimentos de análises fisiológicas em relação ao estresse hídrico (DAMI & HUGHES, 1997). Porém nestas mesmas décadas alguns autores relataram que mesmo PEG de alto peso molecular poderia ser absorvido por algumas plantas como milho, feijão, solanáceas e estar presente em folhas envelhecidas de plântulas de tomate. No entanto, nenhuma consequência foi atribuída a essa absorção, já que ela pode ocorrer em um ritmo relativamente lento nestes vegetais, sendo 1mg/ g de peso fresco por semana (LAWLOR, 1970; ROY et al., 2009).

Devido a propriedade do PEG em simular uma condição de déficit hídrico, não ser degradado e não causar toxidez, ele tem sido utilizado em soluções aquosas, como meio osmótico para simular estresse hídrico em varias culturas (LAWLOR, 1970; ROY et al., 2009).

2.6 Genes de referência (*housekeeping genes*)

Os genes de referencia, assim denominados em experimentos de expressão gênica, referem-se a genes de expressão basal ou seja, genes de proteínas (enzimas) que participam de vias essenciais para a manutenção celular e que teoricamente não apresentam expressão variável. Isso pode ser observado na literatura, onde em experimentos com qPCR são utilizados rotineiramente, como genes de referência, β -actina, GAPDH, Ubiquitina, dentre outros, os quais são presumivelmente estáveis e permitem a quantificação de outros genes, sendo por tanto, utilizados como padrão interno para comparação da expressão de determinado gene em diferentes tratamentos (THELLIN et al., 1999). Notavelmente, poucos são os trabalhos que reportam a seleção de genes de referência em diversos organismos e principalmente em cana-de-açúcar.

ISKANDAR et al. (2004) citam que o GAPDH pode ser um gene de referência em cana-de-açúcar para avaliar a expressão em diferentes tecidos e/ou órgãos. No entanto um gene de referência com expressão estável em um órgão e/ou tecido de um organismo pode não ser adequado para a normalização de expressão de uma determinada condição experimental no mesmo ou em outro organismo (SINGH & GREEN, 1993; ISHITANI et al., 1996; JAIN et al., 2006), visto que pode alterar sua expressão em função do tratamento e /ou condição utilizados.

Vários “softwares” foram desenvolvidos para avaliar a estabilidade de expressão de genes candidatos a referência, dentre eles o NORMfinder,. O NORMfinder é um programa algoritmo para a identificação da melhor normalização de um conjunto de genes candidatos (ANDERSEN et al., 2004). Este algoritmo está fundamentado em um modelo matemático para expressão gênica sendo usada uma estatística sólida, se estimando não apenas variação de expressão global dos genes candidatos à normalização, mas também a variação entre os subgrupos da amostra definida (ANDERSEN et al., 2004). Notavelmente, o programa NORMfinder fornece um valor de estabilidade para cada gene, que é uma medida direta para a variação estimada de expressão. Os genes candidatos são, portanto, avaliados em termos de estabilidade de expressão, de maneira que não apresente variação durante o experimento. Desta maneira, a identificação de genes de referência em diferentes tratamentos, promove uma maior precisão quanto aos resultados a serem obtidos (JAIN et al., 2006).

Objetivos

- Estabelecer um sistema in vitro, para avaliação da tolerância à seca em cana-de-açúcar utilizando-se polietilenoglicol;
- Desenvolver um banco de dados com sequencias de aquaporinas identificadas pelo banco de dados de NCBI;

- Analisar o banco de dados do SUCEST para busca de sequências de aquaporinas em cana-de-açúcar;
- Determinar a filogenia das classes de aquaporinas em cana-de-açúcar por meio de banco de dados do SUCEST;
- Avaliar por meio de *northern blot* virtual qual ou quais os órgãos onde se expressão ScPIP2;1;
- Analisar o perfil transcricional de aquaporina ScPIP2;1 em folhas de dois genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para tolerância à seca, por meio da análise da expressão diferencial em tempo real;
- Avaliar diferentes genes descritos como genes de referência.

III. Material e métodos

3.1 Material vegetal: os dois genótipos: IACSP94-2094 (tolerante), IACSP97-7065 (sensível) utilizados neste trabalho foram disponibilizados pelo laboratório de cultura de tecidos do Centro de Cana IAC (Instituto Agronômico de Campinas) Ribeirão Preto-SP, Brasil.

3.2 Experimentação com Polietilenoglicol (6000): plantas individualizadas e enraizadas de cada genótipo foram colocadas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 150g/L de polietilenoglicol (PEG 6000) como a melhor concentração neste tipo de trabalho, de acordo com avaliações prévias realizadas pelo CENA. Os tratamentos foram representados pelo tempo de imposição do estresse *in vitro*, correspondendo à: 0h (controle), 24h, 48h, 72h e 120h, totalizando três repetições biológicas por tratamento. Apenas folhas foram coletadas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C.

3.3 Experimentação em campo: o plantio foi realizado em Latossolo ácrico na Usina Jalles Machado, Goianésia, GO, Brasil, utilizando-se parcelas de cinco

metros de comprimento e espaçamento de 1,5 metros, em blocos casualizados, com três repetições, em experimento irrigado e não irrigado. Para o experimento irrigado, sensores de umidade colocados a 30, 60 e 90 cm de profundidade, foram delineados em bloco, para controle da lâmina d'água a ser aplicada. O experimento foi estabelecido em novembro de 2009, e as coletas (irrigado e não irrigado) iniciadas a partir de maio de 2010, da seguinte forma: controle, tratamento irrigado coletado em maio de 2010; coleta 1: tratamento sequeiro coletado também em maio de 2010 (30 dias sem água); coleta 2: tratamento sequeiro, coletado em julho de 2010 (90 dias sem água); coleta 3: tratamento de sequeiro, coletado em agosto de 2010 (120 dias sem água).

3.4 Maceração do material vegetal: após a coleta dos tratamentos, procedeu-se a maceração do material vegetal em nitrogênio líquido, seguido de extração do RNA total das amostras. Para tal procedimento, os cadinhos e pistilos foram tratados com água DEPC ativa por duas horas, autoclavados e mantidos em estufa (120 °C) por uma noite.

3.5 Extração de RNA total com Trizol Reagent (Invitrogen): a extração de RNA com o reagente Trizol seguiu as recomendações do fabricante mas com algumas adaptações. Após a completa maceração do material vegetal, pesou-se 0,25g e adicionou-se 1mL de TRizol (Invitrogen), seguido de vortéx por 5 minutos. A seguir, adicionou-se 260 µL de clorofórmio em cada amostra, centrifugando-se a 12000xg por 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo acrescentando 650 µL de Isopropanol, incubado 10 minutos em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o pélete lavado com 1,3 mL de etanol 75%. A seguir, o pellet foi agitado em vórtex por alguns segundos, e centrifugado a 7500g por 5 minutos a 4 °C. Após, descartou-se o sobrenadante, secando-se o pellet em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, sendo finalmente ressuspensionado em 50 µL de água DEPC inativa previamente aquecida a 60°C, e armazenado em ultrafreezer – 80 °C.

3.6 Avaliação da qualidade e quantidade do RNA total: a qualidade do RNA total extraído foram avaliadas em gel de agarose desnaturante 2%, (MOPS 1X, 0,05% (v/v) formaldeído, TBE 1X preparado em água DEPC). A quantidade do RNA foi avaliada em espectrofotômetro GeneQuant 100 (GE Healthcare Life Science).

3.7 Síntese de DNA complementar (cDNA): a síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1,5 µg/µL de RNA extraído, segundo as recomendações do fabricante (*Fermentas*).

3.8 Busca em banco de dados por homólogos à aquaporinas: para a identificação das aquaporinas em cana-de-açúcar criou-se um banco de dados contendo mais de 2400 sequências de aminoácidos de aquaporinas de diversos organismos, obtidas à partir do genBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) por meio de busca por palavra-chave e proteínas descritas na literatura. A identificação de sequências de cana-de-açúcar (SAS, *Sugarcane Assembled Sequences*), foi feita utilizando o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUI et al., 1997). Em seguida estas sequências foram utilizadas como iscas (*drivers*) para a busca no banco de dados do SUCEST (<http://sucest-fun.org/>) utilizando o TblastN com valor de stringência de $E < 10^{-5}$. Os SAS resultantes dessa análise de similaridade, pelo programa BlastX foram anotados manualmente (e-value mínimo de $e10^{-5}$). A taxa de cobertura do SAS em relação à proteína *driver* original mínima utilizada foi a de 50%.

3.9 Multialinhamento e filogenia: as sequências de nucleotídeos de aquaporinas de cada SAS e as sequências completas de proteínas das aquaporinas PIP2 de cana, milho, arroz e arabidopsis foram alinhadas pelo software ClustalX v1.8 (THOMPSON et al., 1997) baseada no coeficiente de similaridade de Jaccard. A análise filogenética foi realizada utilizando o método de agrupamento vizinho mais próximo (*neighbor-joining* (NJ)) e a confiabilidade da árvore foi estimada pelo uso de “bootstrap” com 1000 repetições, usando-se o programa MEGA *version* 2.1, KUMAR et al. (1994).

3.10 Perfil de expressão diferencial das aquaporinas pela análise *in silico* (Northern Blot Virtual): utilizou-se a base de dados do SUCEST para obter informações sobre a transcrição das PIP2 entre as bibliotecas (Northern Blot Virtual). A frequência dos *reads* de cada SAS foi normalizada pelo número total de *reads* de cada biblioteca e o número total de *reads* de todas as bibliotecas.

3.11 Desenho dos primers: o par de iniciadores ScPIP2;1 (*forward* e *reverse*) foi elaborado a partir do programa *Primer3*, designando-se a temperatura de dissociação (T_m) entre 59 e 61 °C, e o tamanho de *amplicons* entre 100 e 250pb. O par de iniciadores foi testado no programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>) para estabilidade, T_m , conteúdo de GC (%) e interações entre iniciadores.

3.12 Seleção do gene de referência: quatro genes candidatos a referência descritos na literatura foram selecionados e comparados neste estudo: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Actina (ACT), Ubiquitina2 (UBQ2) e RPL (*ribosomal protein-like 354*) (JAIN et al., 2006) avaliados via qPCR. Para comparação dos resultados, utilizou-se o programa NORMfinder (ANDERSEN et al., 2004).

3.13 Análise da expressão gênica da aquaporina ScPIP2;1: as reações de qPCR foram realizadas no termociclador PCR tempo real IQ5 (BioRad), em volume final de 10 μ L, contendo 5 μ L de *SYBR Green super mix* (Fermentas), 0,4 μ M de *primer forward*, 0,4 μ M de *primer reverse*. As amostras de transcritos reversos de cada genótipo, em duplicatas biológicas em cada tratamento foram delineadas em triplicatas para a montagem da reação. As condições de amplificação foram: 95 °C por 10min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 30 s e 72 °C por 30 s de acordo com o protocolo Fermentas. A metodologia aplicada para a avaliação de sequências diferencialmente expressa foi o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os resultados de quantificação relativa (QR) foram baseados no tempo 0 h controle para o experimento *in vitro*. Para o experimento de campo, o tratamento controle foi baseado no irrigado da primeira coleta. Também foi considerada a curva de

dissociação de *primer* (*melting*) entre 72 °C e 95 °C para identificação de possíveis ampliações inespecíficas (*dímeros de primers*), além da inclusão de controle negativo sem cDNA e a curva padrão de 5 pontos de diluição serial (1:10, 1:50, 1:100, 1:250 e 1:500) com “pool” de cDNA de todas as amostras para a eficiência de amplificação.

IV. RESULTADOS

4.1 Avaliação de candidatos a genes de referência (*housekeeping genes*)

Avaliação previa de genes de referência são de suma importância em trabalhos de expressão gênica, porém, poucos trabalhos têm realizado este tipo de avaliação, o que muitas vezes pode comprometer um resultado final devido à variação deste gene durante o experimento. Dos genes descritos como referência para avaliações de expressão gênica na literatura (ISKANDAR et al., 2004) quatro (UBQ2, GAPDH, RPL354 e ACT) foram avaliados neste trabalho. A análise dos dados pelo programa NormFinder revelou que o gene UBQ2 apresentou menor variação de expressão gênica entre os tratamentos (Figura 4) e por esse motivo, foi escolhido como normalizador das análises realizadas neste trabalho.

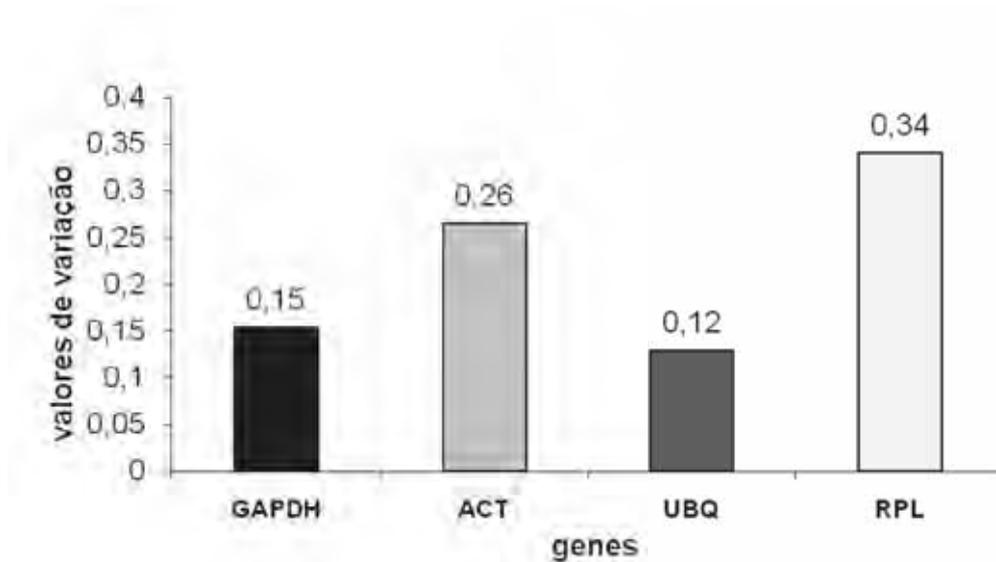


Figura 4. Perfil de expressão gênica para os genes de referência GAPDH (Gliceraldeído-fosfato-desidrogenase), ACT (Actina), UBQ (Ubiquitina2) e RPL (*ribosomal protein-like 354*), em experimento com cana-de-açúcar submetida ao cultivo *in vitro* com polietilenoglicol 15% avaliado pelo programa NORMfinder.

4.2 Imposição do estresse osmótico induzido por PEG (Polietilenoglicol) 15% em cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar

As plantas submetidas ao tratamento com PEG 15% em meio de cultura *in vitro* apresentaram uma resposta característica, como, folhas amareladas e secas ao final dos tratamentos principalmente para o genótipo sensível (Figuras 5. A e B). Também, cinco dias após o início do tratamento (120h), observou-se oxidação do meio de cultura, provavelmente devido à liberação de compostos fenólicos liberado pelo tecido injuriado.

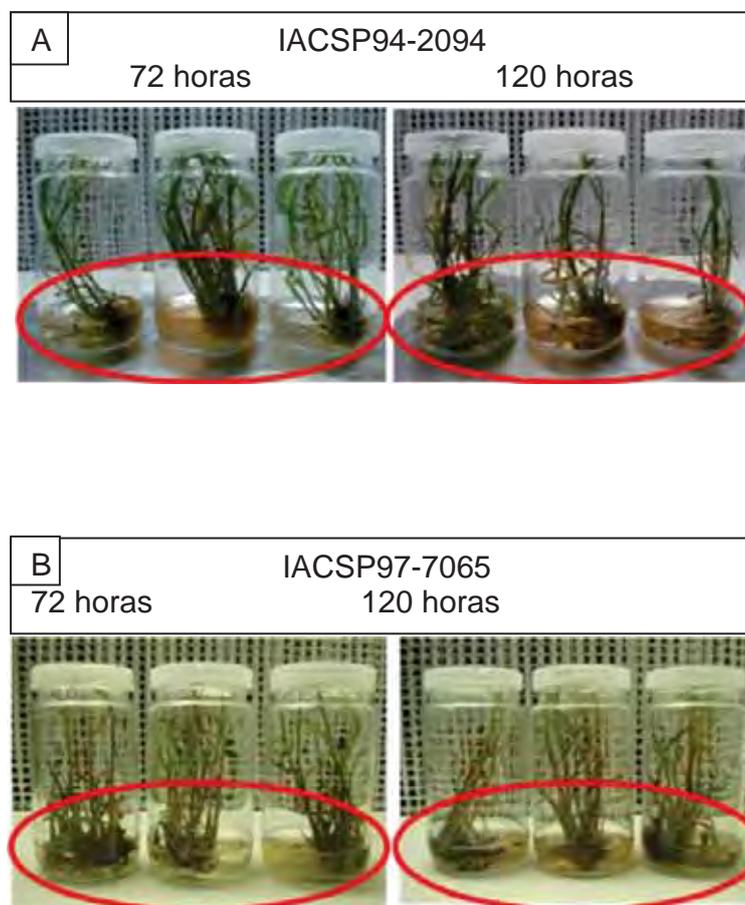


Figura 5. Plantas cultivadas *in vitro* apresentando resposta ao estresse osmótico mediado por PEG 15% nos tratamentos 72 e 120 horas nos genótipos, **(A)** tolerante IACSP94-2094 e **(B)** sensível IACSP97-7065, evidenciando a oxidação do meio de cultura, círculo vermelho.

4.3 Busca por sequências homólogas de aquaporinas, análise filogenética e perfil de expressão *in silico*

Foram identificados 63 SAS de cana a partir de sequências homólogas às aquaporinas por meio de Blast e palavra-chave. As análises foram refinadas por

meio do uso do BlastX no genbank (NCBI), resultando em 33 SAS que atenderam aos critérios de anotação. Os SAS foram anotados pela similaridade com as proteínas *drivers*, classificando-se como aquaporinas apenas as sequências cujos homólogos tenham sido verificados experimentalmente ou a análise de suas sequências publicadas em periódicos. A árvore filogenética dos SAS mostra a formação de 4 grupos de aquaporinas. Conforme observado na Figura 6, os SAS de cana contêm identidade com as quatro classes de aquaporinas conhecidas, sendo que a subfamília PIP foi dividida em PIP1 e PIP2. As PIP2 atualmente são bem descritas e relacionadas à seca em raízes e folhas de arroz (*Oryza sativa*) (SAKURAI et al., 2005; LI et al., 2008), milho (*Zea mays*) (ZELAZNY et al., 2009; LOPEZ et al., 2003) e *Arabidopsis thaliana* (ALEXANDERSSON et al., 2005).

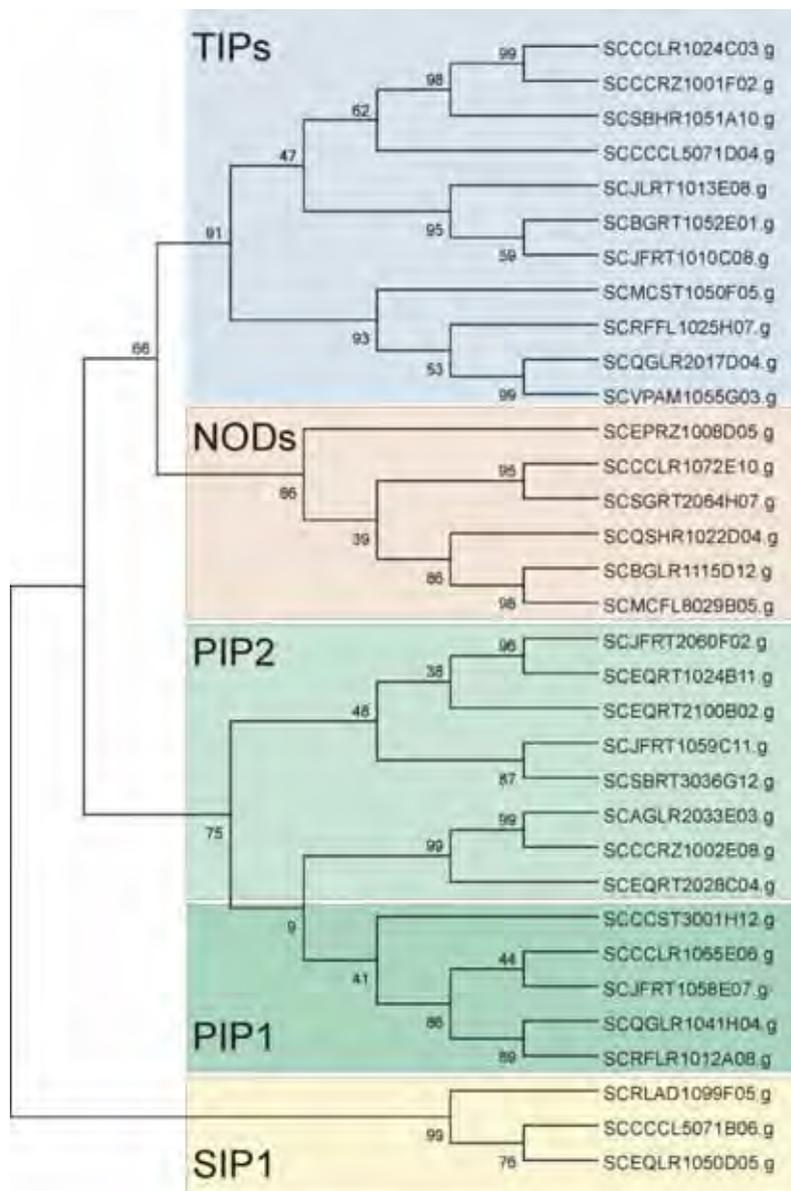


Figura 6. Árvore filogenética (dendrograma) das sequências de nucleotídeo de cana-de-açúcar (SAS, *Sugarcane Assembled Sequences*), mostrando quatro classes de aquaporinas. Os números nos ramos representam acurácia (%) obtida por “bootstrap”.

As sequências de aminoácidos de PIP2 conhecidas em milho, arroz e *arabidopsis* foram alinhadas pelo ClustalX com as SAS traduzidas de PIP2 cujas sequências codificantes apresentaram-se completas (dado não mostrado). Foram atribuídos os seguintes nomes a estas sequências: ScPIP2;1 (SCJFRT1059C11), ScPIP2;2 (SCEQRT2100B02), ScPIP2;3 (SCEQRT1024B11), ScPIP2;4 (SCCCST3001H12), ScPIP2;5 (SCCCLR1065E06), ScPIP2;6 (SCRFLR1012A08) e ScPIP2;7 (SCQGLR1041H04). A árvore filogenética gerada apresentou quatro grupos. O primeiro grupo foi formado pelas sequências das monocotiledôneas (milho, arroz e cana) e inclui todas as sequências de cana analisadas; o segundo grupo foi formado exclusivamente por sequências de *arabidopsis*; o terceiro grupo foi formado por sequências de *arabidopsis* e arroz e, por último, o quarto grupo foi formado por duas sequências de arroz. O primeiro grupo se dividiu em dois subgrupos. Um deles inclui ScPIP2;1, ScPIP2;2 e ScPIP2;3 e o outro as demais sequências de cana. Subgrupos menores mostraram que as sequências de cana, exceto ScPIP2;5 e ScPIP2;6, estão mais próximas de sequências de milho e/ou arroz do que de outras da própria cana, o que sugere que as sequências de cana apresentam as mesmas funções das sequências homólogas de arroz e milho (ScPIP2;1 com *ZmPIP2;5* e *OsPIP2;3*; ScPIP2;2 com *ZmPIP2;4* e *OsPIP2;2*; ScPIP2;3 com *ZmPIP2;6* e *OsPIP2;4*; ScPIP2;7 com *ZmPIP2;1*) (Figura 7).

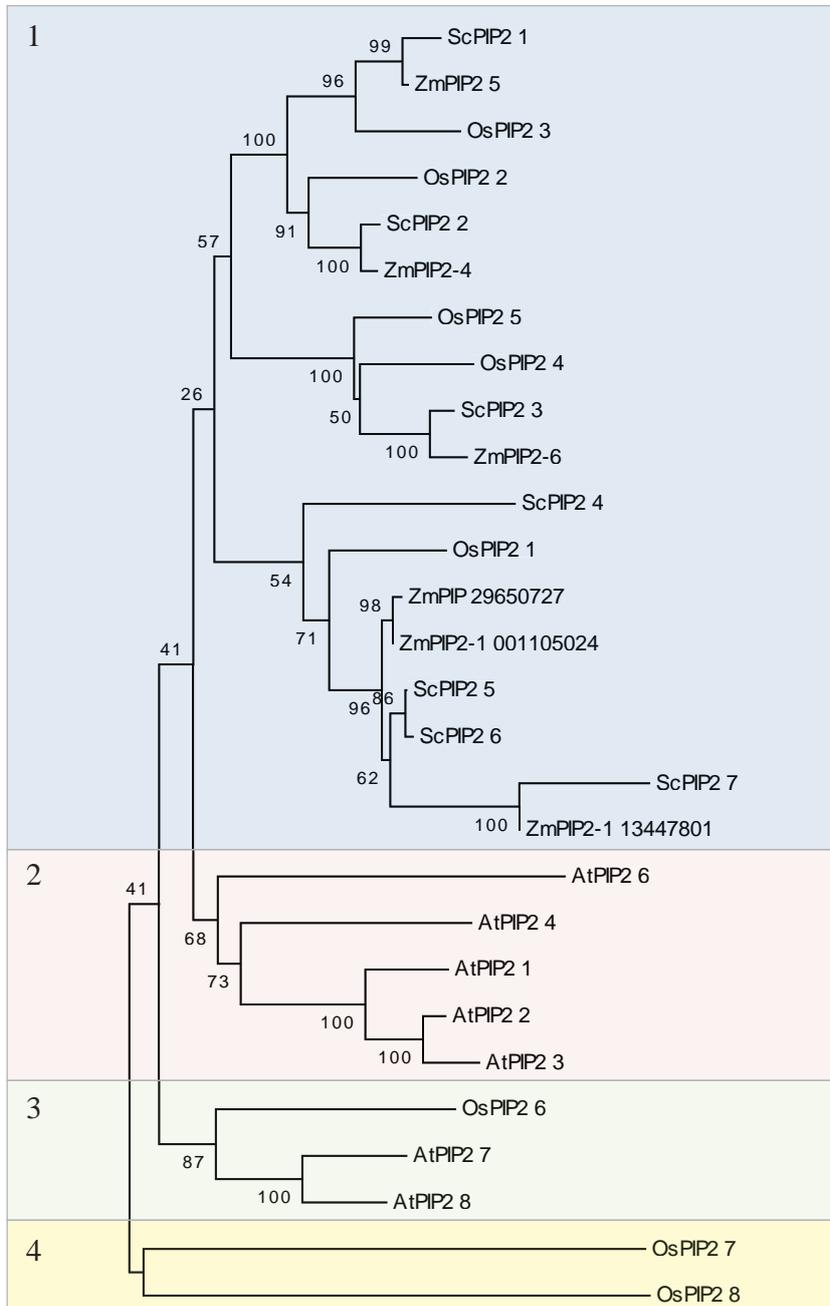


Figura 7. Árvore filogenética (dendrograma) das sequências de proteína de PIP2 descritos na literatura de arroz (*Os*), milho (*Zm*), Arabidopsis (*At*) e as SAS de cana (*Sc*), todas traduzidas em proteínas completas, em quatro

subdivisões (1 a 4). Os números nos ramos representam acurácia (%) obtida por “bootstrap”.

No banco de dados SUCEST estão depositados 260.000 clones de cDNA que foram parcialmente sequenciados de 26 bibliotecas padrão de cDNA geradas à partir de diferentes tecidos de cana em diferentes estágios fenológicos (VETTORE et al., 2003). A partir destes dados foi extraído do SUCEST o *Northern Blot Virtual* dos 13 SAS homólogos aos PIP2 (Tabela 1). As SAS com maior abundância de transcritos foram SCCCLR1065E06 (~30 *reads*/10.000 clones sequenciados), SCQGLR1041H04 (~25 *reads*/10.000 clones sequenciados), SCEQRT1024B11 e SCCST3001H12 (~10 *reads*/10.000 clones sequenciados). SCCCLR1065E06 e SCQGLR1041H04 foram formados por *reads* de bibliotecas de diversos tecidos, exibindo um perfil de expressão constitutivo. SCEQRT1024B11 e SCCST3001H12 apresentaram maior número de transcritos em plantas adultas, respectivamente, na biblioteca de pontas e ápices da raiz da gema e na biblioteca do quarto entrenó do colmo de plantas adultas. Interessantemente, SCJFRT1059C11 foi o único SAS que apresentou *reads* provenientes da biblioteca de folhas de plântulas estioladas, cuja condição fisiológica desta biblioteca se aproxima da condição de estresse por déficit hídrico (Tabela 1). A *ScPIP2;1* (SCJFRT1059C11) foi alvo de investigação neste trabalho devido a sua expressão em folhas estioladas mostrada pela análise *in silico*, corroborando o relato de que PIP2 apresentam regulação em resposta ao déficit hídrico em folhas (HEINEN et al., 2009), embora seu papel em folhas ainda seja muito pouco conhecido.

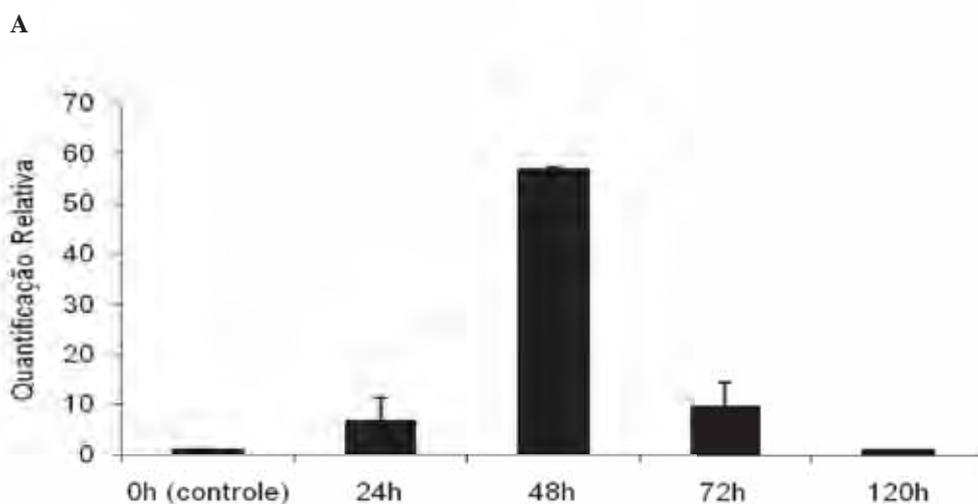
Tabela 1. Perfil de expressão diferencial pela análise *in silico* das SAS de cana-de-açúcar entre as bibliotecas do SUCEST. Valores da tabela representam a abundância relativa das SAS (número de *reads* das bibliotecas por 10.000 clones sequenciados no projeto SUCEST).

Nome -SAS	Nome*	MR	TR	SE	LR	LV	LB	CO	RT	RZ	CL	PL	Total
SCJFRT1059C11	ScPIP2;1	0	0	0	0	2,2	0	0	0	3,6	0	0	5,8
SCSBRT3036G12	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0	0,4
SCEQRT2100B02	ScPIP2;2	0	1,3	0	0	0	0	0	0	1,6	0	0,7	3,6
SCJFRT2060F02	-	0	0,9	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0	1,3
SCEQRT1024B11	ScPIP2;3	0	1	0	0	0	0	0	0	8,2	0	1,1	10,3
SCCCST3001H12	ScPIP2;4	1,7	0	0	0	0	0	6,8	0,8	0,3	0	1	10,6
SCCCLR1065E06	ScPIP2;5	1,5	6,7	3,5	4	0	0,8	5,9	0	3,2	1,8	3,9	31,3
SCRFLR1012A08	ScPIP2;6	1,5	0,7	0	2	0	0	0	0	0	0	3,5	7,7
SCRUFL1116B09	-	0	0,65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,65
SCVPST1061H08	-	0	0	0	0	0	0	1,45	0	0	0	0	1,45
SCMCAM2084B07	-	0,75	0	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	1,35
SCJFRT1058E07	-	0	4	0,55	0	0	0	1,1	0,7	0,8	0	0	7,15
SCQGLR1041H04	ScPIP2;7	0,35	11,6	1,6	0,3	0	0	2,1	1,7	2,8	3,5	2	25,95

* sequência completa da região codificante em proteína.

4.4 Expressão gênica da Aquaporina ScPIP2 nos genótipos avaliados em experimentação com PEG *in vitro*

O genótipo tolerante IACSP94-2094 durante o tratamento com PEG 15% mostrou sensível aumento na expressão de *ScPIP2* para este genótipo em 24h, e aumento de aproximadamente 57 vezes em 48h de estresse quando comparados ao controle (0h). O tratamento subsequente 72h também apresentou maior nível de expressão que o controle, sendo 10 vezes mais expresso, porém já após 120h de exposição a expressão reduziu ao nível basal, próxima ao 0h (Figura 8, A), podendo ser resultante de uma aclimatação das plantas à condição estressante. Diferentemente do genótipo tolerante, o genótipo sensível IACSP97-7065 apresentou leve aumento de expressão nas primeiras avaliações (24h e 48h) e atingiu maiores níveis de expressão em 72h (23 vezes mais expresso) e 120h (15 vezes mais expresso quando comparados ao controle) de exposição ao PEG (Figura 8, B).



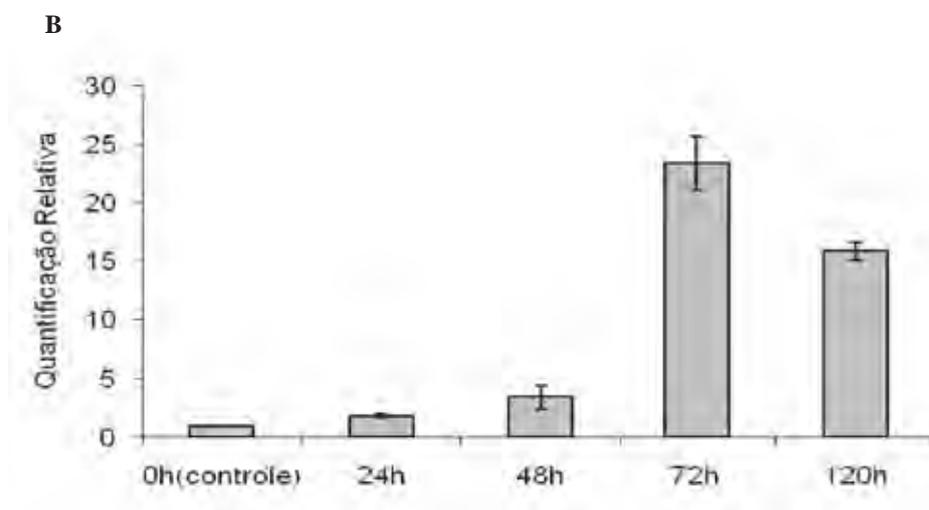


Figura 8. Perfil de expressão de *ScPIP2;1* no genótipo tolerante IACSP94-2094 (A) e no genótipo sensível IACSP97-7065 (B), expostos ao tratamento com PEG 15% após 24h, 48h, 72h e 120h. No eixo vertical é apresentada a quantificação relativa das amostras comparadas ao controle 0h.

4.5 Diferenças no perfil de expressão gênica de Aquaporina *ScPIP2;1* nos genótipos IACSP94-2094 e IACSP97-7065 em tratamento *in vitro*

Os resultados de expressão de *ScPIP2;1* obtidos para ambos genótipos proporcionou a comparação de resposta ao estresse entre eles. Assim, o acúmulo de transcritos de mRNA para o gene *ScPIP2;1* foi investigado durante o estresse imposto com 15% PEG para os tempos 0h (controle sem adição de PEG), 24h, 48h, 72h e 120h nos dois genótipos. A abundância dos transcritos *ScPIP2;1* aumentou e atingiu o máximo no genótipo sensível exposto ao tratamento com PEG em 72h e 120h (próximo a escala LOG de 10000 vezes mais expresso que o tempo 0h controle), enquanto que no tolerante, o nível de mRNA mais elevado ocorre no tratamento 48h (próximo a 100 na escala LOG), o qual diminui a níveis basais em 120h de tratamento com PEG (Figura 9).

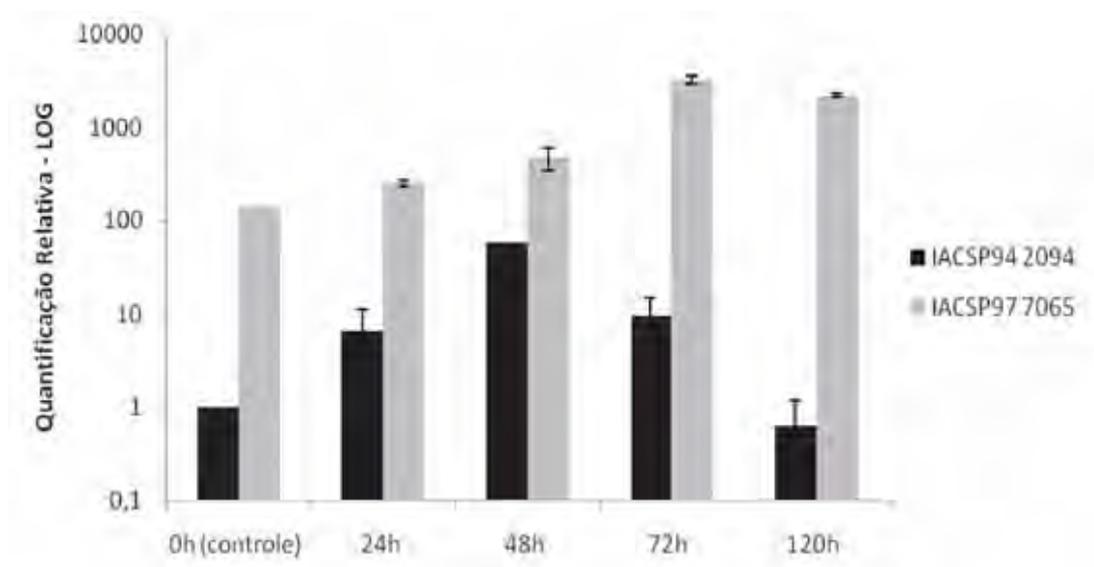


Figura 9. Perfil de expressão relativa de *ScPIP2;1* nos genótipo tolerante IACSP94-2094 e sensível IACSP97-7065, expostos ao PEG 15% após 24h, 48h, 72h e 120h. No eixo vertical é apresentada a quantificação relativa das amostras comparadas ao controle 0h, em escala logarítmica (LOG).

4.6 Comparação do perfil da expressão gênica *ScPIP2;1* nos genótipos IACSP94-2094 e IACSP97-7065 em avaliação de campo

Com o objetivo de se verificar a correlação existente entre o experimento conduzido *in vitro* utilizando PEG e em condições naturais de campo, a expressão das *ScPIP2;1* também foi investigada nos dois genótipos, em experimentos conduzidos a campo. As amostras obtidas de plantas irrigadas de cada genótipo foram definidas como controle e comparadas com as de plantas expostas a 30, 90

e 120 dias de completa privação de água (sem precipitação ou irrigação). Os resultados de campo para o período de 30 e 90 dias após o início da seca não demonstraram variação para os perfis de expressão relativa tanto no genótipo tolerante quanto no sensível, em relação ao controle. No entanto, aos 120 dias, os níveis de transcritos *ScPIP2;1* no genótipo sensível foi cerca de 6,5 vezes maior quando comparado ao controle irrigado, enquanto que no genótipo tolerante, os níveis de transcritos *ScPIP2;1* foi cerca de 3,5 vezes maior em comparação ao controle irrigado (Figura 10). Dessa forma, pode-se inferir que o genótipo tolerante expressa aproximadamente 50% menos *ScPIP2;1* que a sensível em condições de déficit hídrico severo. Assim, tanto em condições de estresse hídrico induzido ou em condições naturais, os níveis de transcritos *ScPIP2;1* foram maiores no genótipo sensível, o que reforça o uso da metodologia de exposição ao PEG como uma importante ferramenta para simulação/indução do déficit hídrico e indicador de tolerância à seca em condições de laboratório. Também, em condições plena de disponibilidade de água em campo, o genótipo tolerante apresentou maiores níveis de transcritos *ScPIP2;1* do que o genótipo sensível. No entanto, à medida que a planta sofreu a imposição do estresse, houve redução dos níveis de transcritos no genótipo tolerante e aumento crescente de sua expressão no genótipo sensível. Esta constatação não foi verificada na condição *in vitro*, visto que no genótipo sensível a expressão de *ScPIP2;1* foi crescente ao longo da imposição do estresse e maior do que o genótipo tolerante.

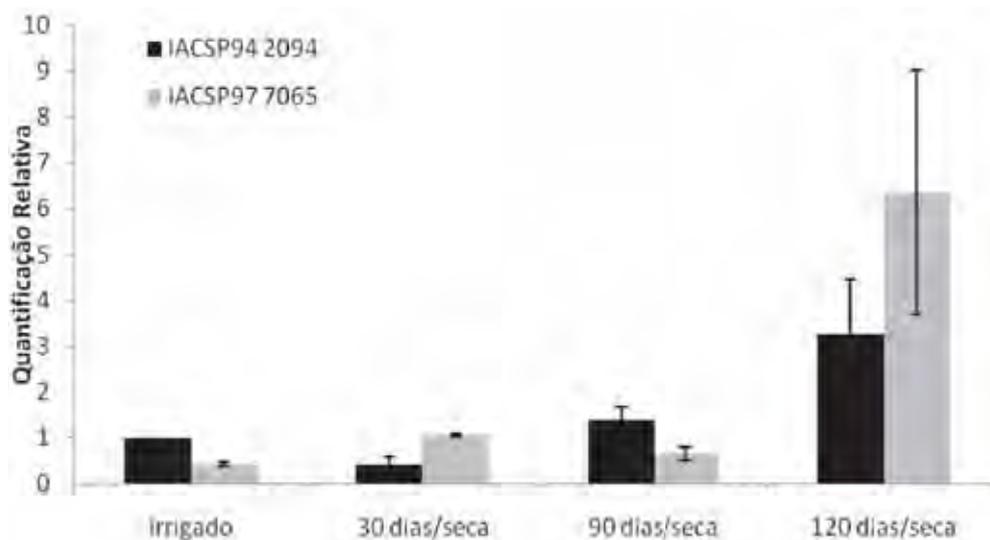


Figura 10. Perfil de expressão relativa de *ScPIP2;1* nos genótipo tolerante IACSP94-2094 e sensível IACSP97-7065, submetidos ao déficit hídrico em condições de campo durante 30, 90 e 120 dias de seca. No eixo vertical é apresentada a quantificação relativa das amostras comparadas ao controle 0h.

V. Discussão

Neste trabalho devido as avaliações experimentais de expressão gênica com PCR quantitativos tempo real (qPCR) que rotineiramente utilizam genes de referência, inicialmente foram testados quatro genes descritos na literatura, os quais são muito utilizados em trabalhos com plantas. Tais genes são presumivelmente estáveis e permitem a quantificação de outros genes (THELLIN et al., 1999). Desta maneira poucos trabalhos reportam a avaliações prévias de genes de referência. Em cana-de-açúcar isso pode ser muito bem observado, o GAPDH pode ser um gene de referência em cana-de-açúcar para avaliar a expressão em diferentes tecidos e/ou órgãos (ISKANDAR et al., 2004). No

entanto um gene de referência com expressão estável em um órgão e/ou tecido de um organismo pode não ser adequado para a normalização de expressão em diferentes condições experimentais. Desta maneira, estudos que busquem avaliar genes de referência são de suma importância (SINGH & GREEN, 1993; ISHITANI et al., 1996; JAIN et al., 2006). Seguindo o princípio de se avaliar e selecionar um gene de referência que seja eficiente e não sofra influência experimental durante o tratamento de estresse hídrico de seca, pudemos identificar que em nossas condições experimentais o gene que apresentou menor variação foi o UBQ2, com 0,12 (Figura 4). Isso demonstra a importância de se avaliar previamente genes tidos como referência em avaliações de expressão gênica.

As análises do perfil de expressão de *ScPIP2;1* em folhas evidenciou tanto em condições de estresse induzido *in vitro* como em condições naturais de campo, que o genótipo sensível apresenta níveis de transcritos maiores ao longo dos tratamentos em relação ao genótipo tolerante. Sabe-se que expressão de AQPs em órgãos específicos de plantas demonstra relação com o estágio de desenvolvimento e com o estado fisiológico do vegetal (HEINEN et al., 2009, sendo também dependente do órgão e tipo de célula (FRAYSSE et al., 2005). Portanto, as diferenças no padrão de expressão gênica entre os experimentos observados para os genótipos tolerante e sensível, provavelmente são devidas as condições experimentais (*in vitro* e em campo), estado fisiológico e do desenvolvimento. Interessante observar que em condições naturais de campo (Figura 10), os níveis de transcrito de *ScPIP2;1* nas condições irrigada foi maior no genótipo tolerante do que no sensível, o mesmo não ocorrendo para o mesmo genótipo nas condições *in vitro*, onde o genótipo sensível apresentou maior expressão no tratamento controle. Provavelmente, outros fatores parecem influenciar a expressão de *ScPIP2;1*, como manitol (JANG et al., 2004); fosforilação (JOHANSSON et al., 1998), pH e Ca⁺⁺ (GERBEAU et al., 2002), estes últimos, certamente alterados numa condição de cultivo *in vitro*.

Sem dúvida, a genética reversa tem se mostrado uma valiosa ferramenta para se elucidar o papel das aquaporinas no transporte de água transmembrana em plantas. Em *Arabidopsis thaliana*, mutantes antisense para PIP1 exibiram

expressão reduzida de aquaporina, reduzindo para um terço o coeficiente de permeabilidade osmótica celular, seguido do aumento do sistema radicular em cinco vezes quando comparados às plantas controles (LIAN et al., 2004). Similarmente, análises funcionais de AQPs através da transformação de plantas (mutantes *antisense*) demonstraram que plantas com baixos níveis de proteínas PIP apresentam menor condutância hidráulica nas raízes (MARTRE et al., 2002; SIEFRITZ et al., 2004), confirmando o fato de que estas proteínas canal participam efetivamente da absorção de água pelo sistema radicular. Estudos fisiológicos recentes demonstraram que a expressão de algumas PIP2 em folhas foi igual ou até maior do que em raízes (LI et al., 2008; AZAD et al., 2008). Em tulipas, AZAD et al. (2008) identificaram isoformas de PIP2 (*TgPIP2;1* e *TgPIP2;2*), com elevado nível de expressão em folhas. Em *Arabidopsis thaliana* os níveis de expressão de 13 isoformas de *PIP2* foram mais elevados nas folhas do que nas raízes (JANG et al., 2004). Em arroz resultados semelhantes foram obtidos com 14 homólogos de AQPs expressos exclusivamente em folhas (HEINEN et al., 2009). Padrões específicos de expressão em diferentes estágios de desenvolvimento de folhas para as *PIP2;7* foram identificados por LI et al. (2008). Estes dados sugerem que as aquaporinas não são apenas importantes nas relações hídricas de raízes, mas também são essenciais para a fisiologia e desenvolvimento de folhas nos vegetais (HEINEN et al., 2009).

Recentemente, foi demonstrado que as aquaporinas também possuem papel na difusão do CO₂ em folhas (VOICU et al., 2009). Tal fato permite explicar os resultados obtidos com os dois genótipos de cana avaliados neste estudo, no qual, tanto em condições de estresse induzido como em condições naturais de campo, o genótipo tolerante IACSP94-2094 apresentou níveis mais baixos de transcritos do que o genótipo sensível. Nas folhas, a resposta ao déficit hídrico está principalmente relacionada a uma diminuição da condutância estomática, sendo esta considerada uma das primeiras estratégias para impedir a desidratação excessiva (CORNIC et al., 1992; INMAN-BAMBER & SMITH, 2005; SALIENDRA et al., 1996; YORDANOV et al., 2003). Os dados fisiológicos obtidos nas condições de campo mostraram que o genótipo tolerante apresentou menor

condutância estomática ao longo do experimento do que o genótipo sensível (dado não mostrado). Em outras palavras, o genótipo tolerante parece perceber antecipadamente a falta de água, fechando os estômatos, e conseqüentemente, reduzindo as perdas de água durante o estresse severo, além de manter a fotossíntese por um período maior que o sensível. Por sua vez, o genótipo sensível apresentou elevada condutância estomática, com maior perda de água (elevada expressão de *ScPIP2;1*) conduzindo decréscimo da osmoregulação, e com perdas significativas de massa fresca e conseqüentemente em produtividade (MACHADO et al., 2009). Assim, em condições de boa disponibilidade de água é esperado que o genótipo tolerante produza mais biomassa do que o sensível, visto que nessa condição, os níveis de transcritos de *ScPIP2;1* foi maior no genótipo sensível.

Em cana-de-açúcar, uma resposta fisiológica imediata conduzindo o rápido fechamento estomático sob déficit hídrico é uma característica desejável e está relacionada com a eficiente sinalização entre as raízes e as folhas. Aspecto este que ainda inclui o fitohormônio ABA como mensageiro primordial para a indução do fechamento estomático (INMAN-BAMBER et al., 2005; NAIDU & BHAGYALAKSHMI, 1967; SALIENDRA & MEINZER, 1989; SMIT & SINGELS, 2006).

Em arábida plantas transgênicas para o gene *vfPIP1* com maior tolerância à seca foram obtidas provavelmente devido ao mecanismo de fechamento estomático sob condições de seca (CUI et al., 2008). As construções antisense para *PIP1* e *PIP2* resultaram em plantas com quantidades reduzidas de ambas as proteínas em folhas durante o estresse hídrico, semelhantes as plantas controle. Porém, ao se aplicar novamente a irrigação após o período de estresse hídrico, as plantas mutantes recuperaram condutividade hidráulica e taxa de transpiração menos rapidamente que as plantas controle. Estes dados levaram os autores a concluir que PIPs também desempenham um papel importante na recuperação da planta ao estresse.

Diferentes padrões de resposta de AQPs também foram identificados em experimentos a campo com arroz de sequeiro e irrigados, sendo os níveis de PIP

aumentados acentuadamente em raízes para ambos, porém, em folhas, os níveis de expressão foram maiores no genótipo de sequeiro do que no irrigado para PIP1 e PIP2 (LIAN et al., 2006). Tal fato demonstra que as respostas das aquaporinas ao estresse de seca são dependentes do genótipo, como observado neste trabalho.

No melhoramento genético da cana-de-açúcar, características como profundidade e arquitetura do sistema radicular (VASCONCELOS et al., 2003), fluorescência da clorofila *a* (GONÇALVES et al., 2010; JAMGPROMMA et al., 2010), abertura e fechamento de estômatos, enrolamento de folhas, número de folhas verdes (MACHADO et al., 2009), acúmulo de osmólitos (MOLINARI et al., 2007), discriminação isotópica e tolerância ao Paraquat (A. Figueira, comunicação pessoal), entre outros, tem sido investigadas como critério de seleção de genótipos com maior vantagem adaptativa em condições restritivas de água. Neste trabalho, o fato das aquaporinas *ScPIP2;1* terem sido induzidas em condição de estresse por seca, fornece evidências para se explorar no melhoramento genético, a tolerância à seca do ponto de vista de absorção/transpiração de água mediada por *ScPIP2;1* embora saiba-se que muitos outros genes estejam envolvidos neste mecanismo.

VI. CONCLUSÕES

- O banco de dados do SUCEST evidenciou a existência em cana-de-açúcar das quatro classes de aquaporinas descritas em monocotiledôneas.
- A experimentação *in vitro* com Polietilenoglicol na concentração de 15% mostrou-se eficiente para induzir estresse hídrico em cana-de-açúcar em condições de laboratório.
- As análises filogenéticas demonstraram a existência das quatro classes de aquaporinas em cana-de-açúcar, como também suas possíveis homologias com aquaporinas de outras monocotiledôneas.

- A avaliação de genes candidatos a referência revelou que, para este experimento, o gene de menor variação é o UBQ2.
- Pela primeira vez foi mostrado a relação do nível de expressão de uma isoforma de PIP2 (*ScPIP2;1*) sob condições de déficit hídrico em folhas de dois genótipos contrastantes para a tolerância à seca em cana-de-açúcar.
- O genótipo sensível IACSP97-7065 exibiu maiores níveis de transcritos *ScPIP2;1* tanto no tratamento de seca *in vitro* como em tratamento de seca a campo quando comparado ao genótipo tolerante IACSP94-2094.
- As aquaporinas *ScPIP2;1* constituem-se em candidatas muito interessantes para serem exploradas nos programas de melhoramento genético convencional de cana-de-açúcar, visando a seleção de genótipos com maior tolerância a seca.

VII. Considerações Finais

A utilização de Polietilenoglicol 6000 a 15%, mostrou-se eficiente para avaliações *in vitro* que simulem condições de seca existente a campo, porém de maneira controlada em laboratório. Desta maneira, avaliações futuras com cana-de-açúcar visando avaliação de seca, poderão ser realizadas em laboratório antes mesmo das avaliações a campo.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRE, P.; BONHIVERS, M.; BORGNIA, M.J. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.14659-14662, 1998.

ALEXANDERSSON, E.; FRAYSSE, L.; SJOVALL-LARSEN, S.; GUSTAVSSON, S.; FELLERT, M.; KARLSSON, M.; JOHANSON, U.; KJELLBOM, P. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. **Plant Mol Biology**, v.59, p.469-484, 2005.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.1, n.24, p402-3389, 1997.

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.

AZAD, A.K.; KATSUHARA, M.; SAWA, Y.; ISHIKAWA, T.; SHIBATA, H. Characterization of four plasma membrane aquaporins in tulip petals: a putative homolog is regulated by phosphorylation. **Plant and Cell Physiology**, v.49, p.1196-1208, 2008.

BAIGES, I.; SCHAFFNER, A.R.; MAS, A. Eight cDNA encoding putative aquaporins in Vitis hybrid Richter-110 and their differential expression. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.1949–1951, 2001.

BECK, E.; H., FETTIG, S.; KNAKE, C.; HARTIG, K.; BHATTARAI. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. **Journal Bioscience**. v.32, p.501-510, 2007.

BIELA, A.; GROTE, K.; OTTO, B.; HOTH, S.; HEDRICH, R.; KALDENHOFF, R. The Nicotiana tabacum plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. **The Plant Journal**, v.18, p.565–570, 1999.

BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; LOCY, R. D. Fisiologia do estresse. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.613-643.

CHAUMONT, F.; BARRIEU, F.; JUNG, R.; CHRISPEELS, M.J. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. **Plant Physiology**, v.122, p.1025-1034, 2000.

CHAUMONT, F.; BARRIEU, F.; WOJCIK, E.; CHRISPEELS, M.J.; JUNG, R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. **Plant Physiology**, v.125, p.1206-1215, 2001.

CHEN, T. H. H.; MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 5, p. 250-257, 2002.

CORNIC, G.; GHASHGHAIE, J.; GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M. Leaf photosynthesis is resistant to a mild drought stress. **Photosynthetica**, v.27, p.295-309, 1992.

CUI, X.H.; HAO, F.S.; CHEN, H.; CHEN, J.; WANG, X.C. Expression of the *Vicia faba* VfPIP1 gene in *Arabidopsis thaliana* plants improves their drought resistance. **Journal of Plant Research**, v.121, p.207-214, 2008.

DAINTY, J.; GINZBURG, B.Z. Irreversible thermodynamics and frictional models of membrane processes, with particular reference to the cell membrane. **Journal of Theoretical Biology**, v.5, p.256-265, 1963.

DAMI, I.; HUGHES, H. G. Effects of PEG-induced water stress on in vitro hardening of 'Valiant' grape. **Plant Cell**, v.47, p.97-101, 1997.

DANIELS, J.P.; SMITH, N. Paton and C.A. Williams. The origin of the genus *Saccharum*. **Sugarcane Breeding Newsletter**, v.36, p.24-39,1975.

DANIELSON, J.A.H.; JOHANSON, U. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. **BMC Plant Biology**, v.8, p.45, 2008.

FAO. Disponível em:< <http://apps.fao.org>>. Acesso em 16 de agosto de 2008.

FINKELSTEIN A. Water movement through lipid bilayers, pores and plasma membranes, **Wiley**, 1987.

FNP Consultoria & Comércio. Anuário da agricultura brasileira. **Agrianual**, São Paulo, p.237-244, 2007.

FRAYSSE, L.; WELLS, B.; MCCANN, M.C; KJELBOM, P. Specific plasma membrane aquaporins of the PIP1 subfamily are expressed in sieve elements and guard cells. **Biology Cell**. v.97, p.519-34, 2005.

GERBEAU, P.; AMODEO, G.; HENZLER, T.; SANTONI, V.; RIPOCHE, P.; MAUREL, C. The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. **Journal Plant**, v.30, p.71-81, 2002.

GONÇALVES, E.R; FERREIRA, V.M.; SILVA, J.V.; ENDRES, L.; BARBOSA, T.P.; DUARTE, W.G. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em genótipos de cana-de-açúcar submetidos à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, p.378-386, 2010.

GUPTA, V.; RAGHUVANSHI, S.; GUPTA, A.; SAINI, N.; GAUR, A.; KHAN, M.S.; GUPTA, R.S.; SINGH, J.; DUTTAMAJUMDER, S.K.; SRIVASTAVA, S.; SUMAN, A.; KHURANA, J.P.; KAPUR, R.; TYAGI, A.K. The water-deficit stress and red-rot-

related genes in sugarcane. **Function Integred Genomics**, v.10, p.207-214, 2010.

HEINEN, R.B.; YE, Q.; CHAUMONT, F. Role of aquaporins in leaf physiology. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.2971-2985, 2009.

HENZLER, T.; YE, Q.; STEUDLE, E. Oxidative gating of water channels (aquaporins) in Chara by hydroxyl radicals. **Plant, Cell and Environment**, v.27, p.1184-1195, 2004.

HOARAU, J. Y.; OFFMAN, B.; D'HONT, A.; RISTERUCCI, A. M.; ROQUES, D.; GLASZMANN, J. C.; GRIVET, L. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum spp.*). In. Genome mapping with AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**. v.103, p.84-97, 2007.

INMAN-BAMBER, N.G.; BONNETT, G.D.; SMITH, D.M.; THORBURN, P.J. Sugarcane physiology: Integration from cell to crop to advance sugarcane production. **Field Crops Research**, v.92, p.115-117, 2005.

ISHITANI, R.; SUNAGA, K.; HIRANO, A.; SAUNDERS, P.; KATSUBE, N.; CHANG, D. M. Evidence that glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture, **Journal Neurochem**, v.66, p. 928-935, 1996.

ISKANDAR, H. M.; SIMPSON, R. S.; CASU, R. E.; BONNETT, G. D.; MACLEAN, D. J.; MANNERS, J. M.; Comparacion of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane, **Plant Mol Biology**, v.22, p.325-337, 2004.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P.; Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Elsevier**, v.345, p.646-651, 2006.

JANG, J.Y.; KIM, D.G.; KIM, Y.O.; KIM, J.S.; KANG, H. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol Biology**, v.54, n.7, p.13-25, 2004.

JANGPROMMA P, SONGSRI P, THAMMASIRIRAK S, JAISIL P. Rapid Assessment of chlorophyll content in sugarcane using SPAD chlorophyll meter across different stress conditions. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.9, n.6, p.368-374, 2010.

JOHANSSON, I.; LARSSON, C., EK, B.; KJELLBOM, P. The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca²⁺ and apoplastic water potential. **The Plant Cell**, v.8, p.1181-1191, 1996.

JOHANSSON, I.; KARLSSON, M.; SHUKLA, V.K.; CHRISPPEELS, M.J.; LARSSON, C.; KJELLBOM, P. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. **Plant Cell**, v.10, p.451-60, 1998.

JOHANSON, U.; KARLSSON, M.; JOHANSSON, I.; GUSTAVSSON, S.; SJOVALL, S.; FRAYSSE, L.; WEIG, A.R.; KJELLBOM, P. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. **Plant Physiology**, v.126, p.1358-1369, 2001.

KJELLBOM, P.; LARSSON, C.; JOHANSSON, I.I.; KARLSSON, M.; JOHANSON, U. Aquaporins and water homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, v.4, p.308-314, 1999.

KUMAR, L.; KAUSHAL, R.; NANDY, M.; BISWAL, B.M.; KUMAR, S.; KRIPLANI, A.; SINGH, R.; RATH, G.K.; KOCHUPILLARI, V. Chemotherapy followed by radiotherapy versus radiotherapy alone in locally advanced cervical cancer: a randomized study. **Gynecologic Oncology**, v.54, n.3, p.15-307, 1994.

LAGERWERFF, J. V.; OGATA, G.; EAGLE, H. E. Control of osmotic pressure of culture solutions with polyethylene glycol. **Science**, p.133-1486, 1961.

LARCHER, W. A Planta sob Estresse. **Ecofisiologia vegetal**, p.341-478, 2004.

LAWLOR, D. W. Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth. **New Phytology**, v.69, p.501-514, 1970.

LI, G.W.; ZHANG, M.H.; CAI, W.M.; SUN, W.N.; SU, W.A. Characterization of OsPIP2;7, a water channel protein in rice. **Plant cell physiology**, v.49, p.1851-1858, 2008.

LIAN, H.L.; YU, X.; YE, Q.; DING, X.; KITAGAWA, Y.; KWAK, S.S.; SU, W.A.; TANG, Z.C. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. **Plant Cell Physiology**, v.45, p.481-489, 2004.

LIAN, H.L.; YU, X.; LANE, D.; SUN, W.N.; TANG, Z.C.; SU, W. Upland rice and lowland rice exhibited different PIP expression under water deficit and ABA treatment. **Cell Research**, v.16, p.651-60, 2006.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 delta-delta Ct Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LOPEZ, F.; BOUSSER, A.; SISOEFF, I.; GASPAR, M.; LACHAISE, B.; HOARAU, J.; MAHÉ, A. Diurnal Regulation of Water Transport and Aquaporin Gene Expression in Maize Roots: Contribution of PIP2 Proteins. **Plant Cell Physiology**, v.44 n.12, p.1384-1395, 2003.

MACHADO, R.S.; RIBEIRO, R.V.; MARCHIORI, P.E.R.; MACHADO, D.F.S.P.; MACHADO, E.C.; LANDELL, M.G.A. Respostas biométricas e fisiológicas ao deficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 44, n.12, p.1575-1582, 2009.

MAUREL, C. Aquaporins and water permeability of plant membranes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.399-429, 1997.

MAUREL, C.; VERDOUCQ, L.; LUU, D.; SANTONI, V. Plant Aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. **Plant Biology**, v.59, p.595-624, 2008.

MAHAJAN, S.; TUTEJA N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Biochemistry Biophysic**. v.444, p.139–158, 2006.

MARTRE, P.; MORILLON, R.; BARRIEU, F.; NORTH, G.B.; NOBEL, P.S.; CHRISPEELS, M.J. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. **Plant Physiology**, v.130, p.2101-2110, 2002.

MOLINARI, C.C.; MARUR, C.J.; DAROS, E.; CAMPOS, M.K.F.; CARVALHO, J.F.R.; BESPALHOK-FILHO, PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v.130, p.218-229, 2007.

MORGAN, J. M.; RODRIGUEZ, M. B.; KNIGHT, E. J. Adaptation to water-deficit in chickpea breeding lines by osmoregulation: relationship to grain yield in field. **Field Crop Research**, v. 27, p.61-70, 1991.

MOUSTAFA, M.A.; MOERSMA, L.; KRONSTAD, W.E. Response of four spring wheat cultivars to drought stress. **Crop Science**, v.36 p.982-986, 1996.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NAIDU, K.M.; BHAGYALAKSHMI, K.V. Stomatal movement in relation to drought resistance in sugarcane. **Current Science**, v.20, p.555-556, 1967.

NCBI. genBank, disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 11 de março de 2011.

PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA, F.R.; VÊNICO, R.Z.N.; OLIVEIRA, K.C.; FELIX, J.M.; VICENTINE, R.; ROCHA, C.S.; SIMÕES, A.C.Q.; ULIAN, E.C.; ZINGARETTI DI MAURO, S.M.; DA SILVA, A.M.; BRAGANÇA, C.A.B.; MENOSSI, M.; MENDES SOUZA, G. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. **DNA Research**, v.12, p.27-38, 2005.

RAMANJULU, S.; BARTELS, D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant Cell Environment**. v.25, p.141-51, 2002.

RAMESH, P. Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. **Journal Agronomic Crop Science**, v.185, p.83-89, 2000.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DAVLETOVA, S.; MITTLER, R. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a

combination of drought and heat stress. **Plant Physiology**. v.134, p.1683-1696, 2004.

ROY, R.; MAZUMDER, P.B.; SHARMA, G.D. Proline, catalase and root traits as indices of drought resistance in bold grained rice (*Oryza sativa*) genotypes. **African Journal of biotechnology**, v. 8, p. 6521-6528, 2009.

SAKURAI, J.; ISHIKAWA, F.; YAMAGUCHI, T.; UEMURA, M.; MAESHIMA, M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. **Plant and Cell Physiology**, v.46, p.1568-1577, 2005.

SALIENDRA, N.Z.; MEINZER, F.C. Relationship between root/soil hydraulic properties and stomatal behaviour in sugarcane. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.16, p.241-250, 1989.

SALIENDRA, N.Z.; MEINZER, F.C.; PERRY, M.; THOM, M. Associations between partitioning of carboxylase activity and bundle sheath leakiness to CO₂, carbon isotope discrimination, photosynthesis, and growth in sugarcane. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.907-914, 1996.

SANCHEZ, A.C; SUBUDHI, P.K; ROSENOW, D.T. Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Plant Mol Biology**. v 48, p.713-726, 2002.

SACK, L.; HOLBROOK, N.M. Leaf hydraulics. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.361-381, 2006.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, v.115, p.327-334, 1997.

SIEFRITZ, F.; OTTO, B.; BIENERT, G.P.; VAN, D.E.R.; KROL, A.; KALDENHOFF, R. The plasma membrane aquaporin NtAQP1 is a key component of the leaf unfolding mechanism in tobacco. **The Plant Journal**, v.37, p.147-155, 2004.

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

SMART, L.B.; MOSKAL, W.A.; CAMERON, K.D.; BENNETT, A.B. MIP genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. **Plant and Cell Physiology**, v.42, p.686-693, 2001.

SMIT, M.A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, v.98, p.91-97, 2006.

STEUDLE, E. Water transport across roots. **Plant and Soil**, v.167, p.79-90, 1994.

STEUDLE, E.; HENZLER, T. Water channels in plants: do basic concepts of water transport change? **Journal of Experimental Botany**, v.46, p.1067-1076, 1995.

STEUDLE, E.; PETERSON, C.A. How does water get trough roots? **Journal of Experimental Botany**, 49, 775–788, 1998.

STEUDLE, E. The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p. 847–875, 2001.

SUCEST. Disponível em:< <http://sucest-fun.org/>> Acesso em: 14 de março de 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: ARTMED Editora S.A., 3a ed., 2004.

THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUSMANS, B.; HENNEN, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E.; Housekeeping genes as internal standards: use and limits, **Journal Biotechnology**, v.75, p.291-295, 1999.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUNGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.17, p.4876-4882, 1997.

TÖRNROTH-HORSEFIELD, S.; WANG, Y.; HEDFALK, K.; JOHANSON, U.; KARLSSON, M.; TAJKHORSHID, E.; NEUTZE, R.; KJELLBOM, P. Structural mechanism of plant aquaporin gating. **Nature**, v.9, n.439, p.94-688, 2006.

TYERMAN, S.D.; BOHNERT, H.J.; MAUREL, C.; STEUDLE, E.; SMITH, J.A.C. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. **Journal of Experimental Botany**, v.50, p.1055-1071, 1999.

União da Indústria de cana-de-açúcar (UNICA): <<http://www.unica.com.br>>
Acesso em: 11 de março de 2011.

VASCONCELOS, A.C.M.; CASAGRANDE, A.A.; PERECIN, D.; JORGE, L.A.C.; LANDELL, M.G.A. Avaliação do sistema radicular da cana-de-açúcar por diferentes métodos. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.27, n.5, p.849-858, 2003.

VERSLUES, P.E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J.-K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v. 45, p. 523–539, 2006.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; SOUZA, G.M.; DA SILVA A.M.; FERRO, M.I.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E.A.; LEMOS, M.V.; COUTINHO, L.L. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for the tropical crop sugarcane. **Genome Research**, v.13, p.2725-2735, 2003.

VOICU, M.C.; COOKE, J.E.K.; ZWIAZEK, J.J. Aquaporin gene expression and apoplastic water flow in bur oak (*Quercus macrocarpa*) leaves in relation to the light response of leaf hydraulic conductance. **Journal Experiment Botany**, v.60, p.4063-4075, 2009.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought and stress tolerance. **Journal of Plant Physiology**, p.187-206, 2003.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell Environ.** v.25, p.131-139, 2002.

ZELAZNY, E.; MIECIELICA, U.; BORST, J.W.; HEMMINGA, M.A.; CHAUMONT, F. An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins ZmPIP2;4 and ZmPIP2;5 to the plasma membrane. **The Plant Journal**, v.57, p.346-355, 2009.

ZHANG, Y.; WANG, Z.; CHAI, T.; WEN, Z.; ZHANG, H. Indian mustard aquaporin improves drought and heavy-metal resistance in tobacco. **Molecular Biotechnology**, v.40, p.280-292, 2008.