

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS, ANÁLISES FISIOLÓGICAS E
EXPRESSÃO DE MIRNAS EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum*
spp.) NA RESPOSTA AO ALUMÍNIO**

Luana Jandhy Mantovanini

Tecnóloga em Biotecnologia

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS, ANÁLISES FISIOLÓGICAS E
EXPRESSÃO DE MIRNAS EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum*
spp.) NA RESPOSTA AO ALUMÍNIO**

Luana Jandhy Mantovanini

Orientador: Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti

Co-orientador: Profa. Dra. Durvalina M. M. dos Santos

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

2017

M293s Mantovanini, Luana Jandhy
Seleção de genótipos, análises fisiológicas e expressão de miRNAs em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na resposta ao alumínio / Luana Jandhy Mantovanini. -- Jaboticabal, 2017
xiii, 65 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Sonia Marli Zingaretti
Co-orientadora: Durvalina Maria Mathias dos Santos
Banca examinadora: Jackson Antonio Marcondes de Souza, Isabela Cristina Gomes Honório
Bibliografia

1. Estresses abióticos. 2. miR159. 3. miR164. 4. miR168. 5. *Saccharum officinarum*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:633.61

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

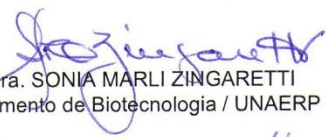
TÍTULO: SELEÇÃO DE GENÓTIPOS, ANÁLISES FISIOLÓGICAS E EXPRESSÃO DE
miRNAs EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) NA RESPOSTA AO
ALUMÍNIO


AUTORA: LUANA JANDHY MANTOVANINI

ORIENTADORA: SONIA MARLI ZINGARETTI

COORIENTADORA: DURVALINA MARIA MATHIAS DOS SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA
(GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. SONIA MARLI ZINGARETTI
Departamento de Biotecnologia / UNAERP - Ribeirão Preto


Pós-doutoranda ISABELA CRISTINA GOMES HONÓRIO
Faculdade de Ciências Agrônômicas / UNESP - Câmpus Botucatu/SP


Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 24 de maio de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Luana Jandhy Mantovanini – nascida em 07 de fevereiro de 1987 em Ribeirão Preto – SP, é tecnóloga em Biotecnologia pela Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP (2010 – 2012). Durante a graduação participou do Programa de Educação Tutorial – PET Biotecnologia atuando em diversos projetos de extensão. Possui experiência profissional de mais de dez anos na área de desenvolvimento de sistemas e bioinformática, atuando, hoje em dia, como desenvolvedora e designer de interface de softwares na empresa Hexagon Agriculture. Em 2014 ingressou no Programa de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Universidade Estadual Paulista – FCAV – UNESP, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, sob orientação da Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti. Desenvolveu a pesquisa da presente dissertação, financiada pela FAPESP, e demais projetos relacionados à área de Genômica Funcional e Biologia Molecular de Plantas.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

Dedico

Ao meu pai Ademir Mantovanini, pelo amor, carinho, amizade, dedicação, paciência, pelas nossas conversas, seus conselhos, apoio e acima de tudo, por ter me dado a honra de ser sua filha.

*“Se eu tivesse uma história, que eu pudesse contar para você,
Eu contaria uma história que certamente te fizesse sorrir...
Se eu tivesse um desejo, que eu pudesse desejar para você,
Eu desejaria que o sol brilhasse todo tempo.”*

(Sunshine on my shoulders, John Denver)

AGRADECIMENTOS

À minha família (e eterna tribo): pai, mãe, irmã, sobrinhos, por todo amor, carinho, incentivo e apoio incondicionais; ao meu namorado Mateus, pela paciência, pelo amor e companheirismo, por ter acreditado em mim e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos; e ao nosso cachorrinho Toddy (meu companheiro de madrugadas em claro), que mesmo passando tão pouco tempo conosco, mostrou o que é o verdadeiro e mais puro amor.

Aos meus amigos, Renan Gonçalves da Silva e Joice de Oliveira Leite pela ajuda, amizade, pela alegria constante e pelos conselhos nos momentos de dificuldade. Sem eles nada disso teria sido possível.

À Universidade Estadual Paulista – FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti pela orientação, por todo aprendizado e compreensão nos momentos difíceis.

Aos colegas de laboratório: Vinicius, Thiago, Cyro e Janeth por toda a ajuda e conselhos.

Ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária por fornecer a estrutura para a realização dos experimentos iniciais de fisiologia, à Profa. Dra. Durvalina Maria Mathias dos Santos pela contribuição e pelas valiosas sugestões, e em especial à Sonia Carregari por toda ajuda e paciência durante as análises.

À Usina São Martinho pelo fornecimento dos toletes de cana-de-açúcar utilizados no trabalho.

A todos os docentes do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas pelos ensinamentos proporcionados.

Ao Prof. Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro pela parceria na realização do experimento.

À unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto por permitir a utilização dos laboratórios e equipamentos para a execução do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e a FAPESP pelo apoio financeiro na realização do projeto FAPESP #2014/19667-8.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho de forma direta ou indireta: MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	17
	2.1 Cana-de-açúcar (<i>Saccharum spp.</i>) e sua produtividade	17
	2.2 Presença de alumínio (Al^{3+}) nos solos e impacto nas plantas.....	19
	2.3 Tolerância da cana-de-açúcar ao alumínio no solo	20
	2.4 microRNAs e seu papel regulatório nas plantas	21
	2.5 microRNAs conservados em plantas expressos em resposta ao Al^{3+}	24
3.	OBJETIVOS	26
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
	4.1 Screening dos genótipos tolerantes e suscetíveis	27
	4.1.1 Análises fisiológicas	27
	4.2 Teste de tolerância das cultivares selecionadas: Fisiologia e expressão dos microRNAs	29
	4.2.1 Material vegetal e condições experimentais	29
	4.2.2 Avaliação da fotossíntese	31
	4.2.3 Medidas do potencial de água nas folhas	31
	4.2.4 Extração do RNA total e microRNAs	31
	4.2.5 Análise da expressão dos microRNAs	31
	4.2.6 Análise estatística	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
	5.1 Screening dos genótipos	33
	5.1.1 Parâmetros fisiológicos e morfológicos de raízes	33
	5.1.2 Teste de coloração de raízes com Hematoxilina	37
	5.2 Fisiologia de folhas e raízes das cultivares selecionadas	42
	5.2.1 Parâmetros fisiológicos	42
	5.2.2 Predição de alvos dos microRNAs	47
	5.3 Expressão dos microRNAs	48
	5.3.1 Expressão dos microRNAs em raízes	48

6.	CONCLUSÕES	53
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8.	APÊNDICES	62

SELEÇÃO DE GENÓTIPOS, ANÁLISES FISIOLÓGICAS E EXPRESSÃO DE MIRNAS EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) NA RESPOSTA AO ALUMÍNIO

RESUMO - A cana-de-açúcar é atualmente uma das principais culturas da agroindústria mundial. Devido à ampla expansão de seu plantio é submetida constantemente a solos não produtivos. A presença de moléculas tóxicas no solo, como o alumínio (Al^{3+}), interfere diretamente no desenvolvimento radicular ocasionando baixa absorção de água e nutrientes levando a pouca produtividade e desenvolvimento das plantas. Os microRNAs tem sido descritos como um dos fatores responsáveis pela regulação gênica e a descoberta dessas moléculas abre um novo caminho para a elucidação da tolerância e adaptação das plantas aos estresses abióticos. Este estudo visou avaliar em duas cultivares de cana-de-açúcar (CTC-2 e RB855453) a expressão dos microRNAs miR159, miR164 e miR168, associados à resposta ao alumínio em espécies como *Arabidopsis thaliana*, arroz (*Oriza sativa*) e tabaco (*Nicotiana tabacum*). Algumas características foram avaliadas, como densidade de raízes (DS), área foliar (AR), produção de massa seca (MS) e teor de prolina nas folhas, em quatro cultivares de cana-de-açúcar submetidas a diferentes concentrações de alumínio. A cultivar CTC 2 foi classificada como tolerante e a RB855453 como sensível ao estresse. Ambas foram selecionadas e em sistema de hidroponia submetidas novamente ao estresse pela toxidez de alumínio na concentração de $221 \mu\text{mol L}^{-1}$. Parâmetros fisiológicos foram mensurados (área foliar, potencial osmótico, taxa de fotossíntese, transpiração, condutância estomática) e a expressão dos miRNAs 159, 164 e 168 avaliada por PCR em tempo real. Plantas das duas cultivares apresentaram alterações fisiológicas e morfológicas ao longo do estresse, com redução significativa para a área foliar da cultivar RB855453. O miR164 e 159 foram induzidos nas duas cultivares, principalmente após 72 horas de estresse, e o miR168 diferencialmente expresso. Esses miRNAs regulam genes e fatores de transcrição que estão envolvidos na resposta e desenvolvimento da planta diante ao estresse por alumínio.

Palavras-chave: Estresses abióticos; miR159; miR164, miR168; *Saccharum officinarum*.

SELECTION OF GENOTYPES, PHYSIOLOGICAL ANALYSIS AND EXPRESSION OF MIRNAS IN SUGARCANE (*Saccharum* spp.) IN RESPONSE TO ALUMINUM

ABSTRACT - The sugarcane is currently one of the main crops of global agribusiness. Due to the wide expansion of its plantation is constantly subjected unproductive soils. The presence of toxic molecules in the soil, such as aluminum (Al^{3+}), directly affects root development, leading to poor absorption of nutrients and water leading to low productivity and development of plants. Studies of the interactions of plants with the environment are being conducted to clarify the resistance or susceptibility of various cultures, favoring the discovery of important mechanisms that participate in physiological and molecular responses to environmental stresses. MicroRNAs have been described as one of the factors responsible for gene regulation and the discovery of these molecules opens a new path for the elucidation of tolerance and adaptation of plants to abiotic stresses. This study evaluated in two sugarcane varieties the expression of microRNA miR159, miR164 and miR168, associated with the response to the aluminum species such as *Arabidopsis thaliana*, rice (*Oryza sativa*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*). Some characteristics were evaluated, such as density (DS), area (AR), dry mass production (DM) and proline content, in four sugarcane cultivars submitted to different concentrations of aluminum. CTC 2 cultivar was classified as tolerant and RB855453 as stress sensitive. Both were selected and in a hydroponics system again submitted to stress by the aluminum toxicity in the concentration of $221 \mu\text{mol L}^{-1}$. Physiological parameters were measured (leaf area, osmotic potential, photosynthesis rate, transpiration, stomatal conductance) and the expression of miRNAs 159, 164 and 168 evaluated by real-time PCR. Plants of both cultivars presented physiological and morphological changes along the stress, with a significant reduction for the leaf area of cultivar RB855453. The miR164 and 159 were induced in the two cultivars, mainly after 72 hours of stress, and the miR168 differentially expressed. These miRNAs regulate genes and transcription factors that are involved in the response and development of the plant in the face of aluminum stress.

Palavras-chave: Abiotic stress; miR159; miR164, miR168; *Saccharum officinarum*;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biogênese dos microRNAs em plantas (modificado de BONNET et al., 2006).	18
Figura 2. Classes de acúmulo de Al em raízes. (A) Coifa, (B) Meristema apical e região de alongamento celular, (C) Região de maturação (região basal). Oliveira (2012)	29
Figura 3. Experimento de estresse por alumínio em sistema de hidroponia	30
Figura 4. Densidade de raízes em cultivares de cana-de-açúcar. Letras maiúsculas entre cultivares e minúsculas entre tratamento demonstram as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) segundo teste de Tukey.....	34
Figura 5. Área de raízes em cultivares de cana-de-açúcar. Letras maiúsculas entre cultivares e minúsculas entre tratamento demonstram as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) segundo teste de Tukey.....	35
Figura 6. Matéria seca de raízes em cultivares de cana-de-açúcar. Letras maiúsculas entre cultivares e minúsculas entre tratamento demonstram as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) segundo teste de Tukey.	36
Figura 7. Teor de prolina em cultivares de cana-de-açúcar. Letras maiúsculas entre cultivares e minúsculas entre tratamento demonstram as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) segundo teste de Tukey.....	37
Figura 8. A) Raízes coradas com hematoxilina. B) Imagem binarizada das raízes utilizando o Software Safira.....	38
Figura 9. A) Raízes coradas com hematoxilina. B) Imagem binarizada das raízes utilizando o Software Safira.....	39
Figura 10. A) Raízes coradas com hematoxilina. B) Imagem binarizada das raízes utilizando o Software Safira.....	40
Figura 11. A) Raízes coradas com hematoxilina. B) Imagem binarizada das raízes utilizando o Software Safira.....	41
Figura 12. Desenvolvimento das raízes nas cultivares CTC2 e RB855453. Onde, RB-C = planta controle; RB-T = planta estressada; CTC-C = controle; e CTC-T = estressada.....	42

Figura 13. Representação esquemática para as alterações fisiológicas presentes em plantas das cultivares CTC2 e RB855453 submetidas a toxidez por alumínio.....	46
Figura 14. Alvo do miR164.....	48
Figura 15. Alvo do miR159.....	48
Figura 16. Alvo do miR168.....	48
Figura 17. Expressão do miR159 nas raízes das cultivares CTC 2 e RB855453 nos diferentes tempos, sob estresse por alumínio.....	49
Figura 18. Expressão do miR164 nas raízes das cultivares CTC 2 e RB855453 nos diferentes tempos, sob estresse por alumínio	51
Figura 19. Expressão do miR168 nas raízes das cultivares CTC 2 e RB855453 nos diferentes tempos, sob estresse por alumínio.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sete principais países produtores de cana-de-açúcar no ano de 2015.....	18
Tabela 2. Sequências dos miRNAs utilizados.....	32
Tabela 3. Quadrados médios da análise de variância dos efeitos do alumínio na densidade (DS), área (AR), produção de massa de matéria seca (MS) e teor de prolina (PRO) nas cultivares CTC-2, CTC-14, RB855453 e RB966928.....	33
Tabela 4. Parâmetros fisiológicos avaliados nas cultivares de cana-de-açúcar CTC2 e RB855453, submetidas ao estresse por alumínio	43

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das culturas de maior notoriedade na agroindústria de regiões tropicais e subtropicais. O Brasil é o principal produtor e gera anualmente mais de 500 milhões de toneladas de cana moída além de exportar toneladas de açúcar e milhares de metros cúbicos de etanol para diversos países.

A cana-de-açúcar apresenta notável importância na agroindústria brasileira e mundial. Além da produção de açúcar e etanol que impulsionam a economia com a exportação global, a cana, também é fonte de energia limpa e renovável, já que seu bagaço e palha possuem potencial que pode suprir boa parte da necessidade energética do país. Com o aumento da demanda por energia a expansão da cultura da cana é fato notório no Brasil e, em função da diversidade de solos e condições climáticas de um país de dimensões continentais existe a necessidade de desenvolvimento constante de cultivares melhoradas e adaptadas às novas situações.

Devido ao potencial energético sustentável da cana-de-açúcar, seu plantio está em constante expansão e com isso são submetidos a diferentes tipos de solos, climas e diversos fatores ambientais. Falta de água, presença de geadas, solos salinos, pobres em nutrientes ou que apresentam moléculas tóxicas são os fatores que mais contribuem para a queda na produtividade e baixo rendimento das cultivares.

A cana-de-açúcar, apesar de resistir a solos com pHs abaixo de 5, não responde de forma positiva à presença de alumínio, que se torna biodisponível e abundante em solos ácidos. A presença dessa molécula em sua forma tóxica (Al^{3+}) no solo promove o baixo crescimento e alongamento de raízes fazendo com que o vegetal absorva menor quantidade de nutrientes e água, comprometendo a condução de moléculas através das células limitando o crescimento do vegetal, interferindo na produção de biomassa.

Os efeitos do alumínio no solo, assim como outros estresses abióticos, acarretam alterações fisiológicas e moleculares, e as plantas, por sua vez, ativam mecanismos para se adaptarem e tolerarem bem as adversidades (HE et al., 2014).

Dentre as respostas moleculares das plantas, os microRNAs (miRNA) tem sido descritos e estudados pela sua importância na regulação pós-transcricional, onde um mRNA alvo é clivado, tem sua tradução interrompida inativando sua proteína correspondente. Estes mecanismos recém-descobertos são, em sua grande maioria, conservados entre as espécies e têm mostrado essencial envolvimento em diversos processos de desenvolvimento das plantas e na sua resposta aos estresses, contribuindo para o entendimento das vias moleculares vegetais além de adicionar informações importantes para o melhoramento de plantas e o desenvolvimento de cultivares mais resistentes, mais produtivas e consequentemente mais rentáveis.

Estudos genômicos com a cultura têm sido efetivos no entendimento da fisiologia, tolerância e susceptibilidade a diversos fatores ambientais como déficit hídrico, geadas e solos pobres, para que com isso projetos de melhoramento sejam satisfatórios e conduzam a cultivares resistentes e produtivas. O alumínio tóxico presente em alguns solos é um exemplo de estresse abiótico. Eles correspondem a mais de 50% das terras aráveis no mundo todo. Correções para tratamento desses solos e adequação a um determinado plantio dependem de recursos financeiros e nem sempre são totalmente eficazes, inviabilizando sua utilização. Portanto, o melhoramento genético se mostra como uma importante alternativa a ser implantada possibilitando o plantio em áreas impróprias devido à presença de Al^{3+} .

Estudos recentes têm mostrado que os miRNAs são os principais mediadores da expressão gênica em plantas, participando ativamente de todo processo imunológico e de resistência. É de grande importância a descoberta de novos miRNAs, bem como a confirmação dos miRNAs miR159, miR164 e miR168 e sua atuação na resposta ao estresse por alumínio, além de certificar-se sobre seus papéis na ativação ou inativação de um gene que confere características de resistência à planta. Além do mais, em cana-de-açúcar ainda não foram relatados microRNAs que participam da resposta ao alumínio, justificando a importância deste estudo.

Com essas respostas abrem-se oportunidades para o desenvolvimento de espécies mais tolerantes, cultivares mais produtivas nos mais variados climas e

solos, além de proporcionar conhecimento para novas descobertas da área genômica vegetal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp) e sua produtividade

A cana-de-açúcar, gênero *Saccharum*, pertence à família Poaceae que compreende espécies de cereais como arroz (*Oriza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*) e milho (*Zea mays*) (VETTORE et al., 2003). As cultivares modernas apresentam alta poliploidia devido ao cruzamento entre as espécies *Saccharum officinarum* L. e *S. spontaneum* L. (COX et al., 2000). Como característica a espécie *S. officinarum* se destaca por acumular grandes concentrações de sacarose, porém apresenta baixa resistência a doenças, enquanto a espécie *S. spontaneum* se caracteriza por não acumular grandes quantidades de açúcar, mas apresenta alta resistência a patógenos e alta adaptabilidade e tolerância a estresses ambientais (SREENIVASAN et al., 1987). O híbrido resultante apresenta ricas características que contribuem para uma maior produção e maior desenvolvimento da planta.

Por toda sua fisiologia adaptada, a cana-de-açúcar resiste bem a temperaturas mais elevadas, mas não tolera baixa disponibilidade de água que é o fator que mais contribui para perdas no plantio, sendo assim uma cultura típica de regiões tropicais e subtropicais onde o clima quente e úmido favorece seu cultivo. Além do Brasil, que figura como maior produtor (627,3 milhões de toneladas), a cana também é importante para a economia de países como Índia, China, Tailândia e Austrália que produzem juntas aproximadamente 626 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por ano (Tabela 1). A produção é bastante afetada pelas variações climáticas e condições de plantio e assim sofre variações ao longo dos anos. Em 2015, o Brasil, líder do ranking, produziu 600 milhões de toneladas de cana moída, exportou 24 milhões de toneladas de açúcar (<http://www.udop.com.br>) e mais de 03 milhões de litros de etanol (<http://www.portalunica.com.br>), tornando a indústria canavieira uma das maiores exportadoras do país.

Tabela 1. Sete principais países produtores de cana-de-açúcar no ano de 2015.

País	Produção em milhões de toneladas
Brasil	650,3
Índia	277,8
China	111,5
Tailândia	68,8
México	50,4
Paquistão	49,4
Austrália	34,5

Fonte: União dos Produtores de Bioenergia – 2015.

No Brasil e no mundo o cultivo de cana-de-açúcar tem crescido potencialmente em função da busca por alternativas sustentáveis na produção de energia e combustíveis menos poluentes. Para atender a demanda mundial de etanol, o Brasil se propôs a dobrar sua produção na próxima década (CHEAVEGATTI-GIANOTTO, 2011), com isso, visando a expansão do plantio, tem concentrado suas pesquisas no melhoramento genético a fim de obter cultivares resistentes aos mais variados solos e climas fazendo com que a cana se torne apta a crescer em diversas regiões.

Os primeiros programas de melhoramento de cana-de-açúcar foram instalados em 1934 (FIGUEIREDO, 2010). Após o sucesso das cultivares obtidas, as técnicas de transgenia ganharam destaque e se estabeleceram como uma alternativa viável de curto prazo. Somente no Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, desde 1959 mais de 40 cultivares de cana-de-açúcar foram desenvolvidas e melhoradas para se adequar a solos com baixa fertilidade, para aumentar os teores de sacarose contribuindo com uma maior produção, além de adquirir resistência a várias doenças (<http://www.iac.sp.gov.br>).

Junto aos projetos de desenvolvimento de novas cultivares, a identificação dos mecanismos moleculares de resposta aos estresses tem sido elucidados. Em

vários vegetais, genes expressos durante condições adversas estão envolvidos diretamente na transcrição, sinalização, proteção de membranas e proteínas e eliminação de compostos tóxicos (WANG, 2003). Em cana-de-açúcar foram identificados por RODRIGUES et al., (2011) 1.670 genes diferencialmente expressos em plantas jovens expostas ao déficit hídrico. Entre os genes identificados estão presentes genes envolvidos nos processos de fotossíntese, transcrição, metabolismo hormonal e nos mecanismos de resposta ao estresse.

2.2 Presença de alumínio (Al^{3+}) nos solos e impacto nas plantas

O solo possui fundamental importância para a produtividade agrícola oferecendo suporte físico, água e nutrientes necessários para o crescimento das plantas. Fatores como textura, disponibilidade de água e nutrientes devem ser levados em consideração para uma eficaz produtividade agrícola.

Dentre os problemas que atingem os solos, a toxidez por alumínio é considerada como um dos mais prejudiciais. Estima-se que no mundo 50% dos solos aráveis sejam ácidos (ZHANG, 2007). No Brasil este tipo de solo compreende 500 milhões de hectares (VITORELLO et al., 2005), sendo que cerca de 70% das terras para produção de cana-de-açúcar possuem alta acidez (SALDANHA et al., 2007).

O alumínio é um elemento não essencial que pode ser encontrado naturalmente nos solos em sua fase sólida sob forma molecular $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou $\text{Al}(\text{OH})_4^-$, e em níveis neutros de pH, entre 5,5 e 8, não afetam o desenvolvimento das plantas (BHALERAO, 2013; RYAN, 1995). Quando o solo atinge valores de pH próximos a 5 ou inferiores, moléculas de hidrogênio atuam sobre o alumínio que passa a ser solubilizado tornando-se um cátion tóxico $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ (ou simplesmente Al^{3+}), esta transformação o torna biodisponível e mais fácil e rapidamente absorvido por todo o sistema radicular das plantas (CARLIN, 2012).

A ação do alumínio nas raízes e no desenvolvimento vegetal depende do tempo de exposição e da concentração dessas moléculas. Em função da rápida reatividade do alumínio as primeiras alterações ocorrem na parede celular, membrana plasmática, citoesqueleto e no núcleo celular (HARTWIG, 2007).

A entrada das moléculas de alumínio através das células inibe o crescimento das raízes que se tornam mais curtas e grossas, absorvendo menos nutrientes e água e transportando mais lentamente moléculas através das células (DRUMMONT, 2001; GUPTA, 2013), desencadeando estresses hídricos e deficiência de nutrientes e minerais (ALMEIDA et al., 2000).

A baixa absorção de P, Mg, Ca e K em arroz (*Oriza sativa*) foi determinada por FREITAS et al. (2006) que observou redução destes nutrientes em mudas quando em cultivo hidropônico na presença de Al.

Ainda atestando o comprometimento das raízes em contato com o alumínio tóxico, estudos realizados por CANÇADO et al. (2008), em cultivares de milho (*Zea mays*) tolerantes e sensíveis ao Al^{3+} evidenciaram alterações na expressão gênica induzida pelo estresse, demonstrando sua influência no alongamento das raízes.

Em cana-de-açúcar a análise da alteração morfológica das raízes foi descrita por WATT (2003), quando avaliou o crescimento de raízes expostas a altas concentrações de alumínio. Seus resultados indicam que a inibição do crescimento radicular pode variar entre 36 a 46%. Igualmente BURKLEW et al., (2012) observaram que mudas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) crescidas por 3 semanas na presença de nanopartículas de óxido de alumínio apresentaram baixo crescimento das raízes, menor crescimento e desenvolvimento de folhas e menor acúmulo de biomassa, atestando assim a susceptibilidade das plantas aos efeitos negativos dessas moléculas.

2.3 Tolerância da cana-de-açúcar ao alumínio no solo

Muitos estudos têm sido publicados a respeito da tolerância de diversas culturas ao alumínio tóxico presente nos solos. A cana-de-açúcar quando comparada com espécies vegetais como milho (*Zea mays*) e arroz (*Oriza sativa*) apresenta menor sensibilidade ao alumínio (SMITH, 2005; OLIVEIRA, 2012). No entanto, estudos com diferentes cultivares comprovam que as taxas de tolerância variam. Segundo LANDELL (1989) e WATT (2003) em *S. officinarum* observa-se uma maior tolerância ao alumínio em comparação à *S. spontaneum*, ainda que o

híbrido resultante dessas duas espécies possa ser consideravelmente resistente ao Al^{3+} , o cultivo crescente em contato com essas moléculas afetam a expansão e o desenvolvimento radicular não permitindo a captação de água presente nas camadas mais profundas do solo.

O processo de tolerância ao alumínio pode ocorrer através de mecanismos que liberam ácidos orgânicos na rizosfera, como o malato e o citrato, que se complexam ao Al impedindo danos no sistema radicular (LIMA, 2011). Estudos realizados por COLLINS et al. (2008) verificaram em mudas de *Arabidopsis thaliana* a expressão do gene TaALMT1 e sua participação no transporte de malato, formando complexos com o Al que não danificam as células.

DRUMMONT (2001) identificou diversos genes expressos em cana-de-açúcar associados aos mecanismos de tolerância em *Arabidopsis thaliana*, trigo (*Triticum aestivum*) e soja (*Glycine max*), mostrando que as vias de regulação são conservadas entre as espécies. A caracterização funcional dos genes responsáveis pela resistência a essas condições fornece bases sólidas para o melhoramento de plantas (PARDO, 2010) e possibilitam a seleção e o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas as condições adversas de plantio.

Também foram identificadas nos últimos anos, pequenas moléculas de RNA (microRNAs) que apresentam papéis regulatórios importantes na resposta das plantas a fatores abióticos. Estudos sobre microRNAs expressos em plantas em solos com altos teores de alumínio já foram descritos em arroz (*Oriza sativa*) (LIMA, 2011), soja selvagem (*Glycine soja*) (ZENG et al., 2012) e tabaco (*Nicotiana tabacum*) (BURKLEW et al., 2012).

2.4 MicroRNAs e seu papel regulatório

O primeiro microRNA, *lin-4*, foi observado por LEE et al. (1993) atuando como regulador do desenvolvimento em nematóides *Caenorhabditis elegans*. Após esta descoberta, outros organismos como plantas e animais foram estudados em busca da presença desses pequenos RNAs atuantes na regulação gênica.

Os microRNAs são pequenas moléculas endógenas de RNA não codificantes que apresentam aproximadamente 21 nucleotídeos (FERREIRA, 2012).

A biogênese dos microRNAs em plantas (Figura 1) é iniciada na transcrição dos genes de microRNAs por uma enzima RNA polimerase II, atuando no pri-miRNA, uma molécula primária em stem-loop (HE et al., 2014). Este longo RNA forma uma estrutura secundária e passa a ser reconhecido por uma enzima *RNase* III, a Dicer Like I (*DCL1*), que processa a molécula de pri-miRNA em um pre-miRNA de tamanho menor. Em conjunto com a proteína HYL1, a Dicer Like I cliva o pre-miRNA em um complexo miRNA:miRNA, que são reconhecidos pela proteína HEN1 e metilados, estabilizando-os (LIMA, 2011). A proteína de transporte HST transfere o miRNA fita-simples metilado do núcleo para o citoplasma onde a proteína ARGONAUTE (*AGO1*) carrega a fita de microRNA madura até um complexo proteico chamado RISC (Complexo de silenciamento por RNA de interferência), que por complementação reconhece seu mRNA alvo havendo clivagem e degradação do mRNA ou inibição de sua tradução (LIMA, 2011).

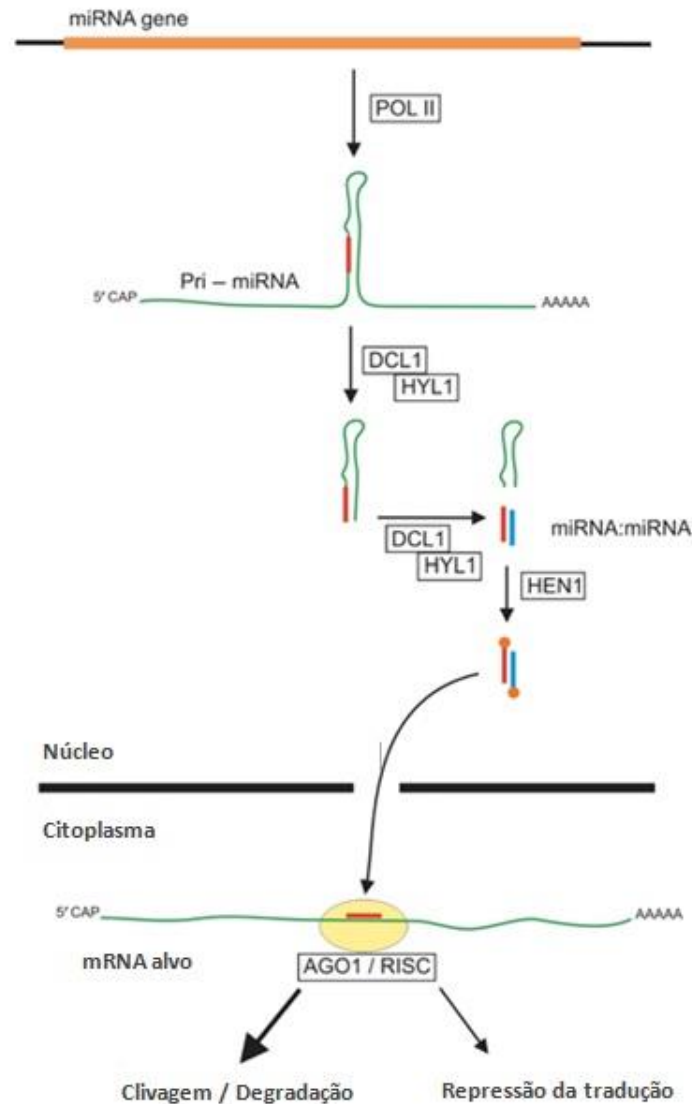


Figura 1. Biogênese dos microRNAs em plantas (modificado de BONNET et al., 2006).

Até o momento, segundo dados do miRBase (<http://www.mirbase.org>), foram identificados 508 microRNAs em *Arabidopsis thaliana*, enquanto que em cana-de-açúcar há descrito 35 microRNAs. A análise destes microRNAs em plantas demonstra a importância dessas moléculas na regulação de um grande número de processos biológicos do desenvolvimento vegetal e nas respostas a estresses.

Dentre as diversas famílias de microRNAs algumas se destacam pela importância na fisiologia e morfologia das plantas. A família miR164 possui papel relevante na regulação de genes CUC e dos fatores de transcrição NAC, atuando

diretamente na morfologia das folhas e no desenvolvimento do caule e raízes (JASINSKI et al., 2010). Fatores de transcrição SHR e SCR ativam as famílias de microRNAs miR165 e miR166 que participam também do correto desenvolvimento do sistema radicular (CARLSBECKER et al., 2010).

Estudos realizados com *Arabidopsis thaliana* e arroz (*Oriza sativa*) mostraram que os microRNAs da família miR156 atuam no desenvolvimento das folhas e são expressos gradualmente durante o desenvolvimento da planta, regulando os fatores de transcrição SQUAMOSA em folhas jovens (XIE et al., 2012). Em *Arabidopsis thaliana*, a família miR159 atua na regulação dos genes GAMYB que possuem participação no desenvolvimento de anteras e no desenvolvimento reprodutivo vegetal, sendo a restrição da expressão dos genes MYB33 e MYB65 induzida pelo miR159, necessária para o crescimento normal de flores e para a fertilidade da planta (RUBIO-SOMOZA; WIGEL, 2013).

Em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foi constatada a participação do miR159, presente em altas quantidades nas gemas axilares, silenciando a expressão de ácido abscísico e ativando a via de sinalização do ácido giberélico responsável pela proliferação celular (ORTIZ-MOREA et al., 2013).

Além da regulação do desenvolvimento vegetal, os microRNAs participam intensamente das vias de resposta a estresses abióticos. Em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foram relatados microRNAs que participam da resposta de tolerância à seca (FERREIRA et al., 2012) e ao frio (THIEBAUT et al., 2012), além de constatados em arroz (*Oriza sativa*) e tabaco (*Nicotiana tabacum*) miRNAs em resposta ao estresse por alumínio (LIMA, 2011; BURKLEW, 2012).

2.5 MicroRNAs conservados em plantas expressos em resposta ao alumínio

Nos últimos anos diversos estudos evidenciaram a conservação dos microRNAs entre as espécies. MicroRNAs que são encontrados em mais de 10 diferentes famílias de plantas podem ser considerados altamente conservados, sendo comprovado por ZHANG *et al.*, (2006) em análises de EST's (Expressed Sequence Tags) que identificaram 481 microRNAs em 71 espécies de plantas diferentes.

Os microRNAs possuem papel importante na regulação do desenvolvimento das raízes em resposta ao alumínio, já que estas são as primeiras estruturas vegetais a entrarem em contato com a molécula. Dentre os principais microRNAs que atuam nas raízes se destacam aqueles que participam da regulação de auxina (HE et al., 2014), fito hormônio essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas que atua no desenvolvimento de raízes laterais (OVERVOORDE et al., 2010).

Famílias de microRNAs como miR164 e miR160 foram identificados regulando fatores de transcrição que agem diretamente no desenvolvimento das raízes. O miR164 é altamente conservado entre as espécies, estando presente em 10 famílias de plantas (ZHANG et al., 2006). Em *Arabidopsis thaliana* possui altos níveis de expressão em raízes (MALLORY, 2004), atuando no fator de transcrição *NAC1* que regula o crescimento lateral. Resultados obtidos por GUO et al., (2005) indicam a participação destes microRNAs na regulação negativa da auxina controlada pelo *NAC1* no desenvolvimento de raízes. A família miR160 é complementar aos reguladores de auxina ARF, participando da clivagem direta dos fatores de transcrição ARF10, ARF16 e ARF17 em *Arabidopsis thaliana* (MALLORY, 2005), afetando a iniciação e a manutenção do crescimento das raízes laterais.

Tendo em vista a importância dos microRNAs na participação do desenvolvimento das raízes é necessário obter respostas sobre a complexa interação desses órgãos com diversos fatores ambientais que ocorrem principalmente no solo, base de todo seu crescimento e manutenção. A definição desses microRNAs como reguladores de crescimento das raízes abre também uma nova oportunidade de entendimento sobre os estresses causados por alumínio (Al^{3+}) e sua ação no sistema radicular da planta.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de miRNAs e alterações fisiológicas nas raízes e folhas de cana-de-açúcar, cultivada em sistema de hidroponia e solução nutritiva, na presença de alumínio.

3.2 Objetivos específicos

- i) Selecionar a cultivar mais tolerante e menos tolerante sob diferentes concentrações de alumínio;
- ii) Analisar parâmetros fisiológicos em folhas e raízes das cultivares submetidas ao estresse por alumínio;
- iii) Avaliar a expressão dos miRNAs 159, 164 e 168 nas raízes das plantas em contato com o alumínio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Screening dos genótipos tolerantes e suscetíveis

O experimento para a seleção de genótipos foi realizado em casa de vegetação na Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Ribeirão Preto - SP (latitude sul 21° 10' 39", latitude oeste 47° 48' 37" e 531 m de altitude) nos meses de setembro a novembro de 2014. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 8, com três repetições. Foram avaliadas quatro cultivares de cana-de-açúcar, CTC-2, CTC-14, RB855453 e RB966928 provenientes da Usina São Martinho, Pradópolis, SP. 65 mini-toletes de uma gema, para cada cultivar foram pré-brotados em recipientes de 700 ml contendo terra vegetal por um período aproximado de 20 dias. Após este período, plantas com características de altura de caule e comprimento de raízes similares foram selecionadas e transferidas para recipientes de 20 L contendo 16 L de solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950) em sistema de hidroponia, permanecendo em aclimatação por sete dias. Após este período, as plantas tiveram suas raízes medidas e a solução nutritiva foi substituída para a adição de cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) nas concentrações de 45; 88; 221; 444; 600; 897 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, de acordo com Watt (2003). O pH da solução nutritiva foi monitorado diariamente e mantido a 4,5 pela adição de HCl, quando necessário, mantendo-se assim estabilizada a molécula de alumínio em sua forma tóxica (Al^{3+}). Após sete dias as plantas foram retiradas, suas raízes lavadas e o comprimento mensurado. Raízes e folhas foram amostradas para os ensaios de respostas fisiológicas.

4.1.1 Análises Fisiológicas

Os genótipos foram avaliados segundo os parâmetros biométricos de densidade, área e massa seca de raízes e teor de prolina nas folhas. Para a determinação da área (dm^2) e densidade (mm/ml) das raízes utilizou-se o sistema de análise de imagens Delta-T Devices LTD, segundo método proposto por Harris & Campbell (1989). As raízes foram submetidas à coloração com azul de metileno 1% (10mg/ml) por dois minutos à temperatura ambiente e, a seguir, dispostas sobre uma bandeja com água para a leitura da imagem por scanner Hewlett Packard modelo 5C. As imagens de cada sistema radicular foram analisadas pelo software Delta-T Scan Root Analysis System tendo a densidade das raízes calculada através da fórmula:

comprimento (mm) de raiz / cm³ de solução

Para a determinação de massa seca (g), amostras de 1 g das raízes foram colocadas em sacos de papel e levadas para secagem em estufa de circulação de ar à 65°C por 48 horas até a obtenção da massa constante.

Para a quantificação de teor de prolina foram utilizados 0,5 g de tecido fresco da folha +1, segundo o método descrito por Bates et al. (1973). A leitura de absorvância das amostras foi realizada no comprimento de onda 520 nm, utilizando o espectrofotômetro Beckman DU 640. A determinação do teor foi calculada com base na massa seca segundo a fórmula:

$$\begin{aligned} & [(\mu\text{g prolina/mL} \times \text{mL tolueno}) / 115,5 \mu\text{g}/\mu\text{mol}] / [(g amostra) / 5] \\ & = \mu\text{mol de prolina/g massa fresca de raízes.} \end{aligned}$$

Os dados foram submetidos ao teste de Tukey utilizando-se o software AgroEstat – Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomico, versão 1.1.0 (Barbosa & Maldonado, 2014).

O acúmulo de alumínio no ápice radicular das plantas foi determinado por coloração das raízes com hematoxilina. Esse método se baseia na complexação da hematoxilina com o alumínio permitindo a visualização da intensidade das concentrações absorvidas pelas raízes. Para o desenvolvimento desta etapa foi diluído 1g de hematoxilina, 0,1g de NaIO₃ e uma gota de NaOH 0,1mol/L⁻¹ em um litro de água destilada.

As raízes armazenadas foram lavadas em água destilada, submetidas em solução de hematoxilina por 15 minutos e novamente lavadas em água destilada para posterior avaliação. Sendo que, para distinção da sensibilidade em classes de acúmulo de Al nos ápices radiculares utilizamos a escala de avaliação adaptada por Oliveira (2012) (Figura 2).

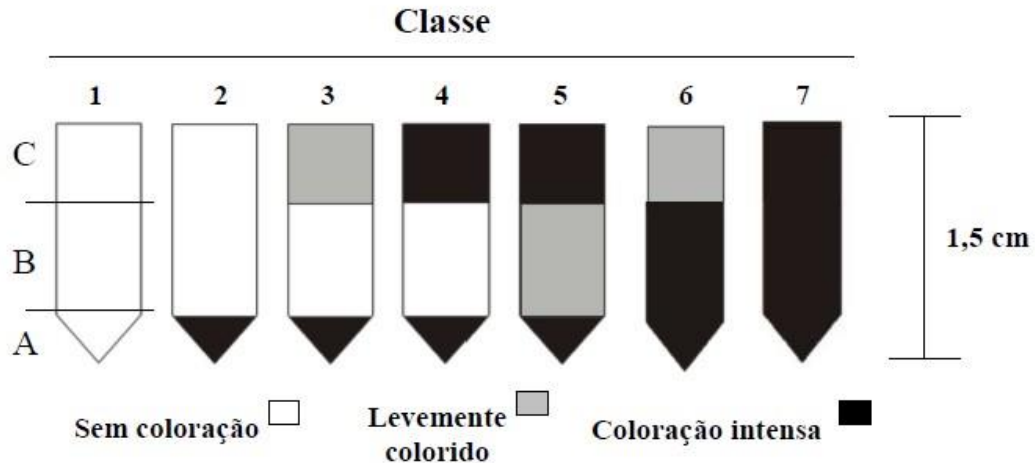


Figura 2. Classes de acúmulo de Al em raízes. (A) Coifa, (B) Meristema apical e região de alongamento celular, (C) Região de maturação (região basal). Oliveira (2012).

Para certificar a análise visual do acúmulo por hematoxilina utilizou-se o software Safira (EMBRAPA, 2015) que permite a visualização da intensidade do alumínio acumulado nas raízes a partir da binarização da imagem.

4.2 Teste de tolerância das cultivares selecionadas: Fisiologia e Expressão de microRNAs

4.2.1 Material Vegetal e Condições Experimentais

Foram utilizadas duas cultivares de cana-de-açúcar, CTC 2 e RB 855453, cedidas pela Usina São Martinho (Pradópolis – SP). Segundo os resultados dos testes anteriores realizados, a cultivar CTC 2 foi escolhida como padrão tolerante e a cultivar RB855453 foi selecionada por ser considerada sensível ao alumínio. Mudas pré-brotadas em substrato comercial com 60 dias foram transferidas para caixas plásticas com 12 L de solução nutritiva. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com condições ambientais semi-controladas (Figura 3).



Figura 3. Experimento de estresse por alumínio em sistema de hidroponia.

A solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1975) foi composta por (mmol L^{-1} para macronutrientes e mol L^{-1} para os micronutrientes: 15 de N (7% como NH_4^+); 4,8 de K; 5,0 de Ca; 2,0 de Mg; 1,0 de P; 1,2 de S; 28,0 de B; 54,0 de Fe; 5,5 de Mn; 2,1 de Zn; 1,1 de Cu; e 0,01 de Mo. Na primeira semana após o transplântio, as plantas foram mantidas em solução com $\frac{1}{4}$ da força iônica. Na semana seguinte, mantidas em solução nutritiva com $\frac{1}{2}$ força e após a terceira semana foram cultivadas em solução com 100% da força iônica. A cada dois dias o volume da solução nutritiva era repostado com água destilada e a cada cinco dias a solução era totalmente substituída. A aeração do sistema hidropônico foi realizada com compressor de ar. O pH da solução foi avaliado com pHmetro Tec-3MPp (Tecnoyon, Piracicaba SP, Brasil). A condutividade elétrica, avaliada com condutímetro Tec-4MPp (Tecnoyon, Piracicaba SP, Brasil). 20 dias após o transplântio das mudas para o sistema hidropônico, foi realizada a adição de Al, à solução nutritiva, em concentração de $221\mu\text{mol L}^{-1}$. O volume das caixas foi completado com água a cada dois dias. A coleta de amostras para a extração de RNAs, foi realizada nos períodos de 24, 48 e 72 horas e 7 dias.

4.2.2 Avaliação da fotossíntese

Foi realizado o acompanhamento das trocas gasosas e atividade fotoquímica a cada dois dias a partir do 20º dia após o transplante. As medidas foram realizadas entre 10:00 e 12:00 horas, com radiação fotossinteticamente ativa (Q) de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e pressão parcial de CO_2 do ambiente (C_a) de $39,6 \pm 0,7$ Pa. Em relação às trocas gasosas, foram consideradas a assimilação de CO_2 (A_N), a transpiração (E), a condutância estomática (g_s), a eficiência do uso da água (EUA, A_N / E), a eficiência intrínseca do uso da água (EUA_i , A_N / g_s), a concentração intercelular de CO_2 (C_i) e a eficiência instantânea de carboxilação (k , A_N / C_i). A temperatura foliar e o déficit de pressão de vapor folha-ar foram monitorados durante as medidas. As medidas foram realizadas com a utilização do aparelho de IRGA modelo LC-pro (ADC BioScientific) nas folhas +1. Para cada tratamento foram feitas quatro repetições.

4.2.3 Medidas do potencial da água nas folhas

Medidas do potencial da água nas folhas (ψ) foram realizadas no momento das avaliações de trocas gasosas com uma câmara de pressão modelo 3005 (Soil Moisture Equipment Corp. Santa Barbara CA, EUA).

4.2.4 Extração do RNA total e microRNAs

O RNA total foi extraído utilizando o kit Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich - USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado e sua qualidade avaliada por gel de agarose desnaturante.

4.2.5 Análise da expressão dos microRNAs

O sistema TaqMan miRNA (Applied Biosystems, USA) foi utilizado para quantificar a expressão dos miRNAs utilizando o stem-loop RT-PCR, conforme instruções do fabricante. O sistema inclui uma transcrição reversa do miRNA em um cDNA mais longo, utilizando primers fornecidos pelo kit, e a seguir quantificação por PCR em tempo real. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram analisados pelo método de $\Delta\Delta C_T$.

A sequência dos miRNAs foi obtida utilizando a ferramenta disponibilizada pela ThermoFisher Scientific (USA) e encontram-se descritos na Tabela 2. Além disso, também foram realizadas a predição dos genes alvo para os miRNAs

avaliados, utilizando o software WMD3 – Web microRNA Designer 3.1 disponível em (<http://wmd3.weigelworld.org/>).

Tabela 2. Sequências dos miRNAs avaliados.

miRNA selecionado	Sequência
miR159	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUG
miR164	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA
miR168	UCGCUUGGUGCAGAUCCGGAC

4.2.6 Análise estatística

Os dados obtidos a partir do screening, bem como, dos parâmetros fisiológicos analisados das cultivares CTC2 e RB855453 foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando-se o software Agroestat 1.0 (BARBOSA; MALDONADO, 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Screening dos genótipos

5.1.1 Parâmetros fisiológicos e morfológicos de raízes

Os resultados indicaram que houve diferenças significativas entre os tratamentos para todas as características avaliadas (Tabela 3).

A partir dos resultados obtidos através do escaneamento das raízes, observou-se que para o fator densidade a cultivar CTC-2 apresentou maiores índices nas diferentes concentrações mostrando-se superior às demais. A cultivar RB855453 manteve a mesma resposta nas diferentes concentrações, porém quando comparada à cultivar CTC-2, apresentou redução significativa na densidade de raiz em quase todas as concentrações, diferenciando-se apenas em 88 e 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As cultivares CTC-14 e RB966928 apresentaram resposta semelhante nas concentrações intermediárias. Resultados semelhantes foram encontrados por Marin & Santos (2008) que verificou significativa redução da densidade de raízes em valores mínimos de Al^{3+} (0,71 mmol dm^{-3}) (Figura 4).

Tabela 3. Quadrados médios da análise de variância dos efeitos do alumínio na densidade (DS), área (AR), produção de massa de matéria seca (MS) e teor de prolina (PRO) nas cultivares CTC-2, CTC-14, RB855453 e RB966928.

Causa da Variação	G.L.	Quadrados Médios			
		DS mm/ml	AR dm ²	MS g	PRO $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF
Cultivares (C)	3	0,0895**	2080341,6**	0,0007**	30,00**
Tratamentos (T)	7	0,0087**	693755,9**	0,0003**	11,60**
Interação CxT	21	0,006**	419048,6**	0,0002**	12,68**
CV (%)		10,7313	9,6904	7,0581	9,9098

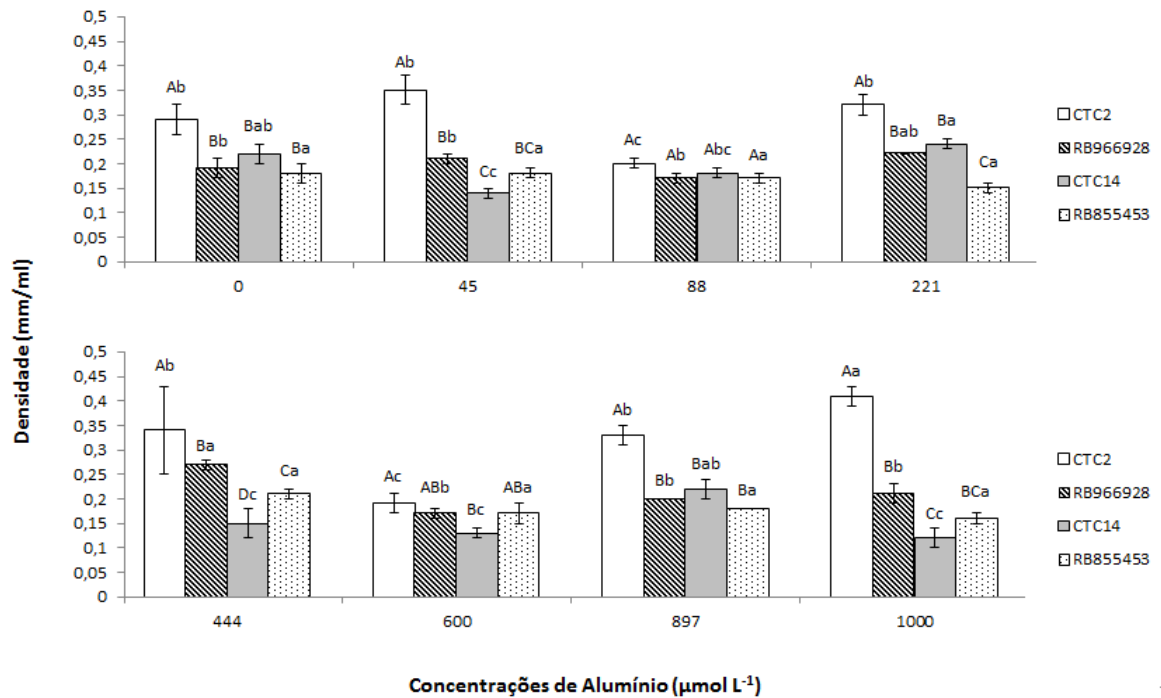


Figura 4. Densidade de raízes em cultivares de cana-de-açúcar. Letras maiúsculas entre cultivares e minúsculas entre tratamento demonstram as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) segundo teste de Tukey.

Analisando o efeito das diferentes concentrações de Al^{3+} na área das raízes tornou-se evidente a diferença entre as cultivares (Figura 5). A presença do alumínio reduziu significativamente a área da raiz, cerca de 50%, da cultivar CTC-2. A redução foi mantida mesmo com o aumento da concentração tóxica de Al. Na dose de $1000 \mu mol L^{-1}$ a cultivar apresentou área acima de $2500 dm^2$, estatisticamente superior às demais cultivares (aproximadamente $2000 dm^2$ para as cultivares RB966928 e CTC-14, e $1500 dm^2$ para a cultivar RB855453).

A cultivar RB966928 manteve-se praticamente constante independente do aumento da concentração de alumínio na solução. Oliveira (2012) avaliou nove genótipos de cana-de-açúcar submetidos a estresse de Al, esses genótipos apresentaram no ápice radical, produção de mucilagem, perda de células epidérmicas, desintegração da coifa e coloração parda, sintomas iniciais do efeito tóxico, que também foi observado no presente trabalho. A taxa de alongamento

radical foi a variável que mais contribuiu para avaliação da tolerância das cultivares ao Al e dependem da interação entre genótipo e a concentração de Al.

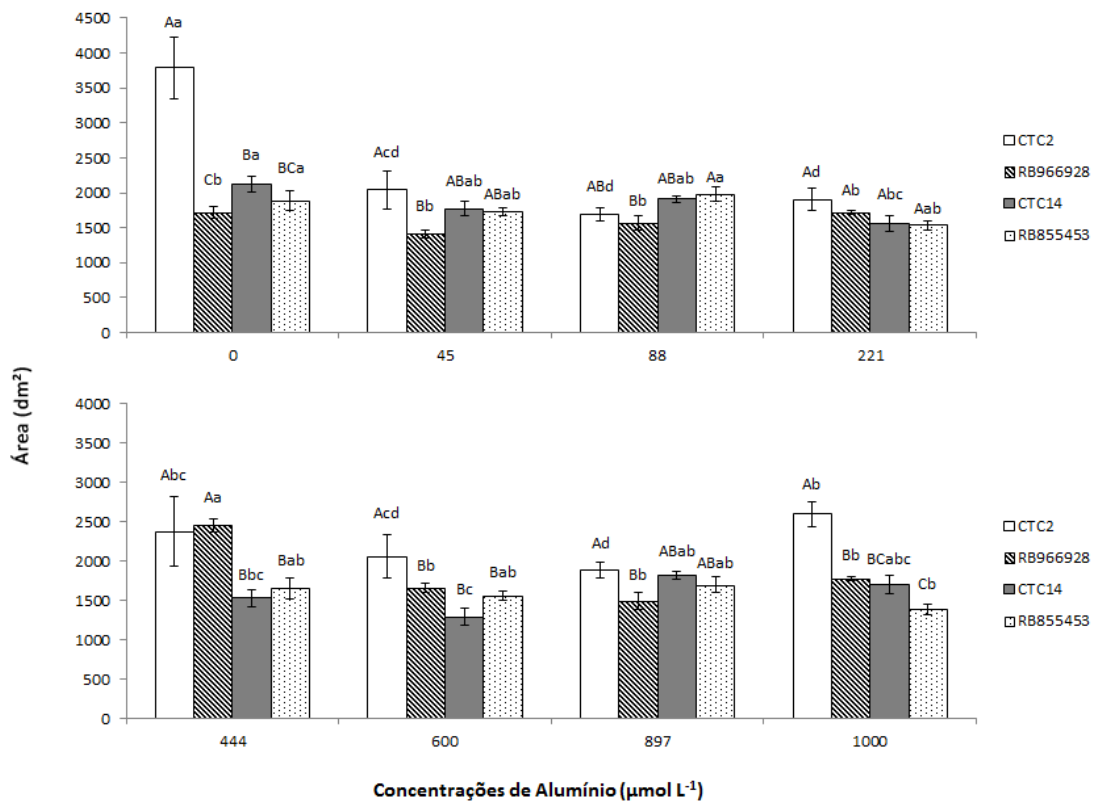


Figura 5. Área de raízes em cultivares de cana-de-açúcar. Letras maiúsculas entre cultivares e minúsculas entre tratamento demonstram as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) segundo teste de Tukey.

A cultivar CTC-2 apresentou maior produção de matéria seca na condição controle ($0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e na concentração de $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 6), sendo superior a $0,06$ gramas, não havendo diferença significativa em relação à cultivar RB966928. Com o acréscimo de alumínio tóxico na solução nutritiva, de 0 para $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ as cultivares CTC-14 e RB855453 apresentaram menor peso de massa seca, respectivamente $0,052$ e $0,048$ g. Ademais, para a cultivar CTC-14 houve redução de massa seca, sendo $0,059$ g para a condição controle e $0,043$ g na dose de $88 \mu\text{mol L}^{-1}$. Portanto, apresentou desempenho de maneira mais coerente ao estresse, diminuindo a massa seca conforme o aumento da concentração de alumínio. Dentre as cultivares avaliadas, a RB855453 obteve menor quantidade de massa seca

quando submetida as dosagens de 221 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (respectivamente, níveis intermediário e máximo da dosagem de alumínio) (Figura 6). A redução da massa seca foi observada de forma semelhante por Custódio et al. (2002), corroborando com o trabalho de Crestani et al. (2009) que avaliaram, em monocotiledôneas, o estresse por alumínio em condição hidropônica.

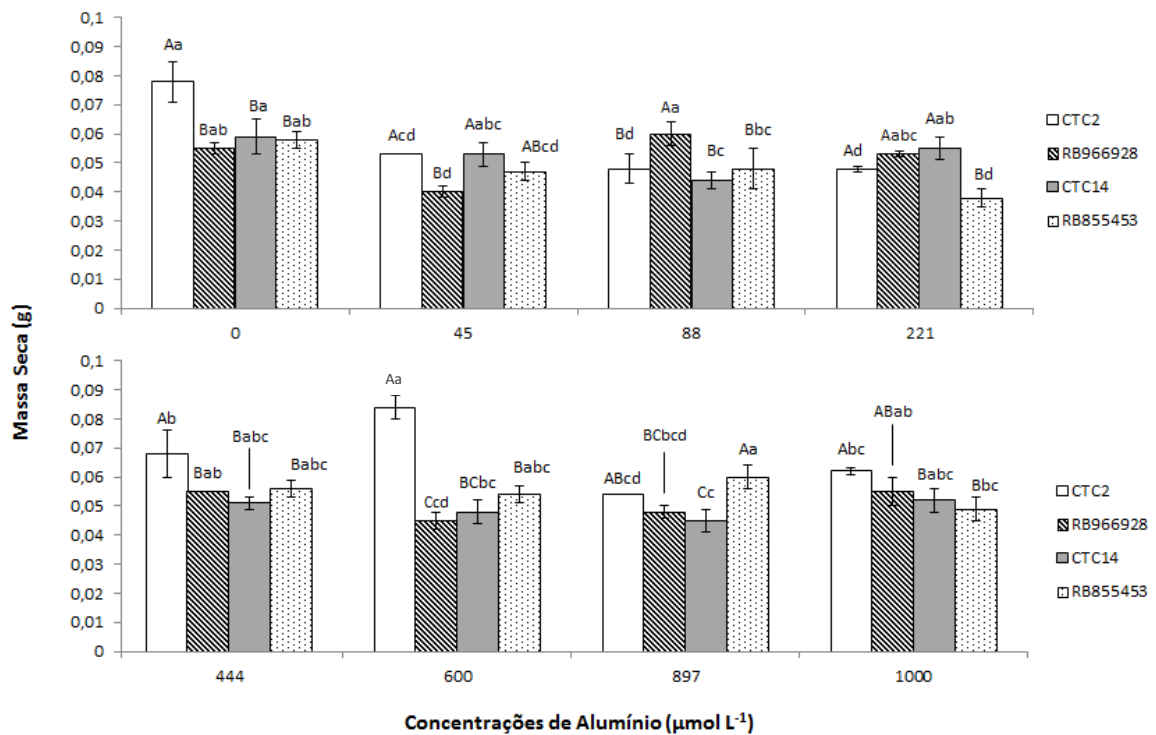


Figura 6. Matéria seca de raízes em cultivares de cana-de-açúcar. Letras maiúsculas entre cultivares e minúsculas entre tratamento demonstram as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) segundo teste de Tukey.

Na condição de 444 $\mu\text{mol L}^{-1}$ as cultivares CTC-2 e CTC-14 produziram níveis similares de prolina (Figura 7). Em contrapartida a cultivar RB966928 apresentou menor teor do aminoácido, mantendo valores similares para a condição controle (3,74 $\mu\text{mol g}^{-1}$), 45 (3,55 $\mu\text{mol g}^{-1}$) e 88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (3,51 $\mu\text{mol g}^{-1}$). Na dose de 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ as cultivares RB855453 e CTC-14 acumularam teor de prolina similar à condição controle. Carlin & Santos (2009) avaliaram a interação dos estresses de Al e déficit hídrico no genótipo de cana-de-açúcar IAC91-5155, recomendado como

resistente à seca. Os autores observaram que mesmo com a presença de substâncias osmoprotetoras (substâncias que mantêm o equilíbrio hídrico e integridade das membranas, proteínas e enzimas) como a prolina, houve redução na produção de biomassa em estresse de Al. Os teores de prolina livre aumentaram significativamente conforme o aumento das concentrações de alumínio.

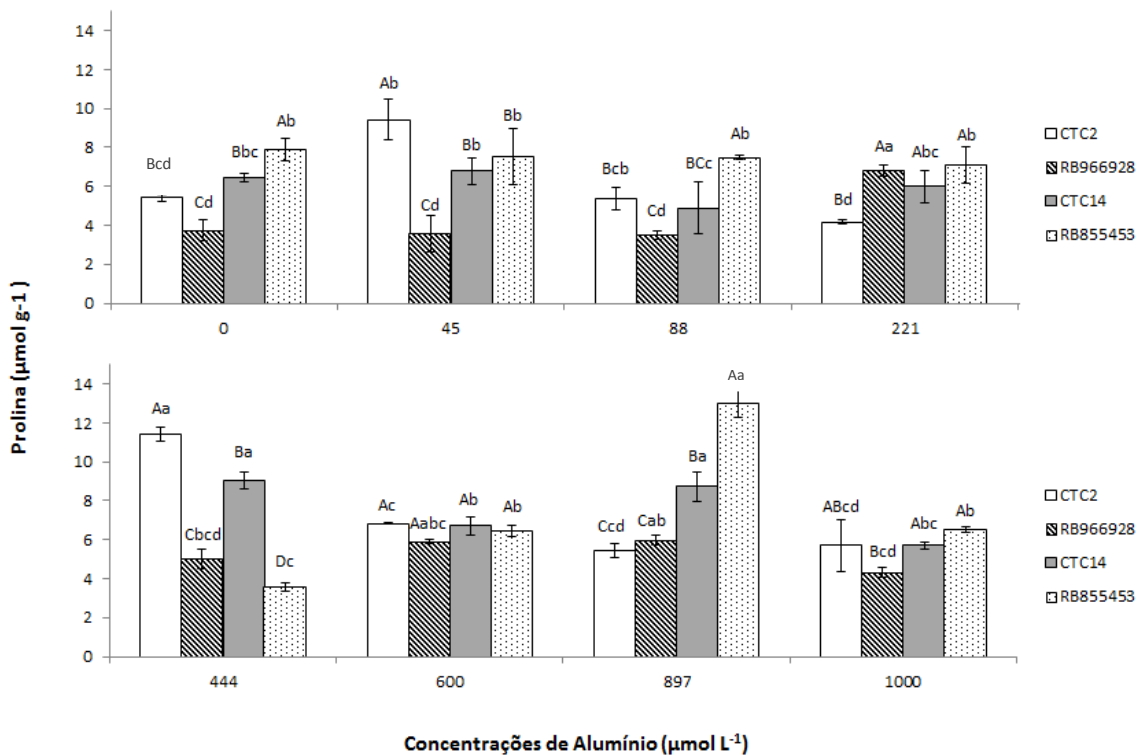


Figura 7. Teor de prolina em cultivares de cana-de-açúcar. Letras maiúsculas entre cultivares e minúsculas entre tratamento demonstram as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) segundo teste de Tukey.

5.1.2 Teste de coloração de raízes com Hematoxilina

O mecanismo das cultivares mais tolerantes é representado pelo acúmulo de Al na região basal, diferentemente do que ocorre em cultivares mais suscetíveis, onde o acúmulo de Al ocorre na região meristemática, com danos físicos maiores do que em tecidos maduros da raiz (RYAN et al., 1995).

A cultivar RB855453 (Figura 8) excluiu o Al^{3+} da sua região meristemática até a dose de $600 \mu\text{mol L}^{-1}$, apresentando acúmulo de Al^{3+} na região basal dos ápices caulinares, sendo classificada como classe 2 a 4 nas dosagens de 45 a $600 \mu\text{mol L}^{-1}$. A partir da dose de $897 \mu\text{mol L}^{-1}$, apresentou significativo acúmulo pelo ápice, portanto, sendo classificada como classe 7.

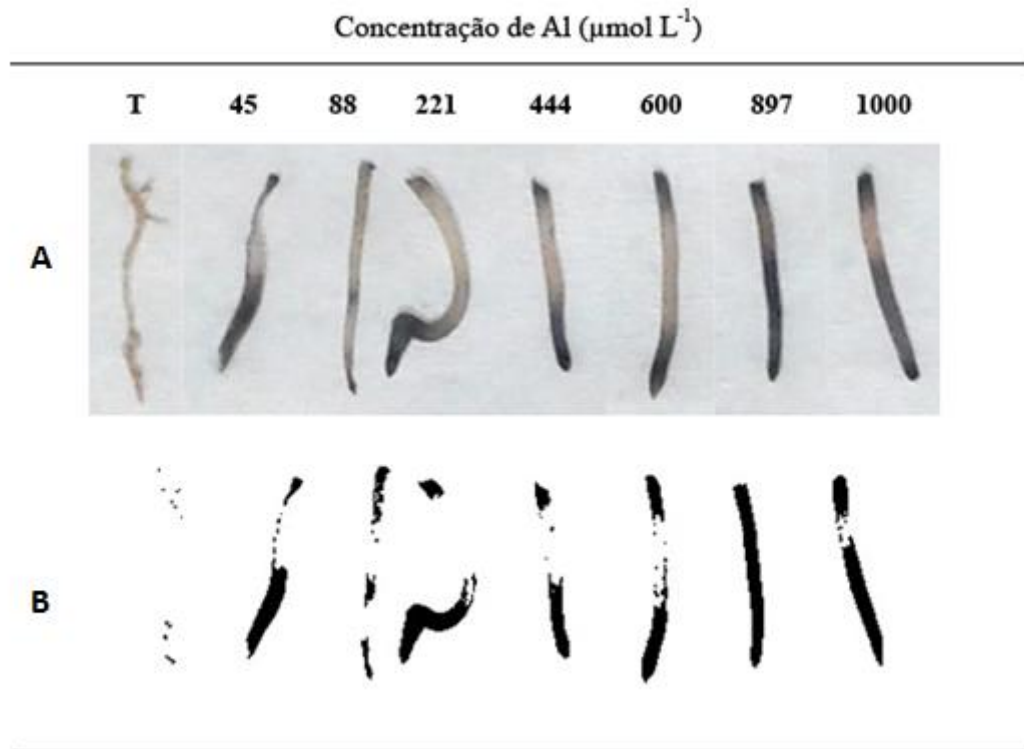


Figura 8. A) Raízes da cultivar RB855453 coradas com hematoxilina. B) Imagem binarizada das raízes utilizando o Software Safira.

De acordo com Oliveira (2012) a cultivar RB855453 apresenta alta sensibilidade ao Al, visto que não apresenta mecanismo de exclusão em nenhuma concentração dessa substância. Em seu trabalho a cultivar já se caracterizou como classe 7 (alto acúmulo de Al no ápice radicular) a partir da dose de $130 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A cultivar RB966928 (Figura 9) excluiu o Al da região meristemática até a dose de $221 \mu\text{mol L}^{-1}$, estando na classe 7 a partir da dose de $444 \mu\text{mol L}^{-1}$, corroborando outros estudos já realizados (OLIVEIRA, 2012), onde a cultivar exclui

o Al em baixas concentrações (dose de $380 \mu\text{mol L}^{-1}$), sendo classificada como classe 7 a partir da dose de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ (bem próximo dos $444 \mu\text{mol L}^{-1}$ constatados).

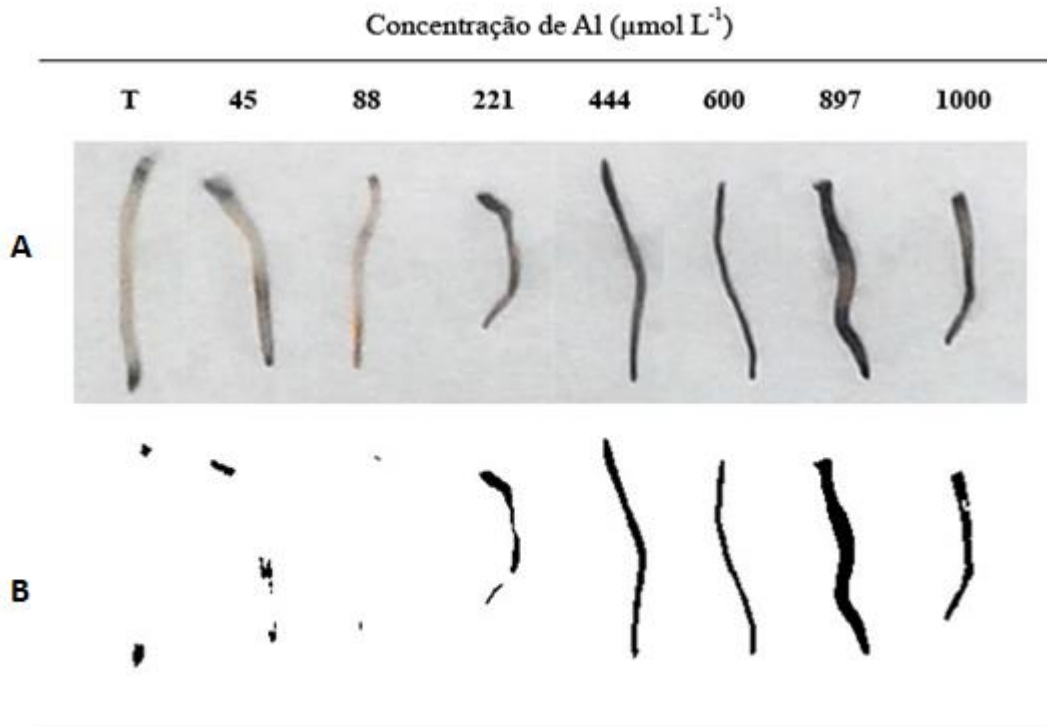


Figura 9. A) Raízes da cultivar RB966928 coradas com hematoxilina. B) Imagem binarizada das raízes utilizando o Software Safira.

Classificada como 4 (pela escala de coloração) na dose de $444 \mu\text{mol L}^{-1}$, a cultivar CTC2 excluiu o Al até essa dosagem, estando na classe 7 a partir da dose de $600 \mu\text{mol L}^{-1}$. Essa cultivar foi mais tolerante em dosagens inferiores a $221 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 10).

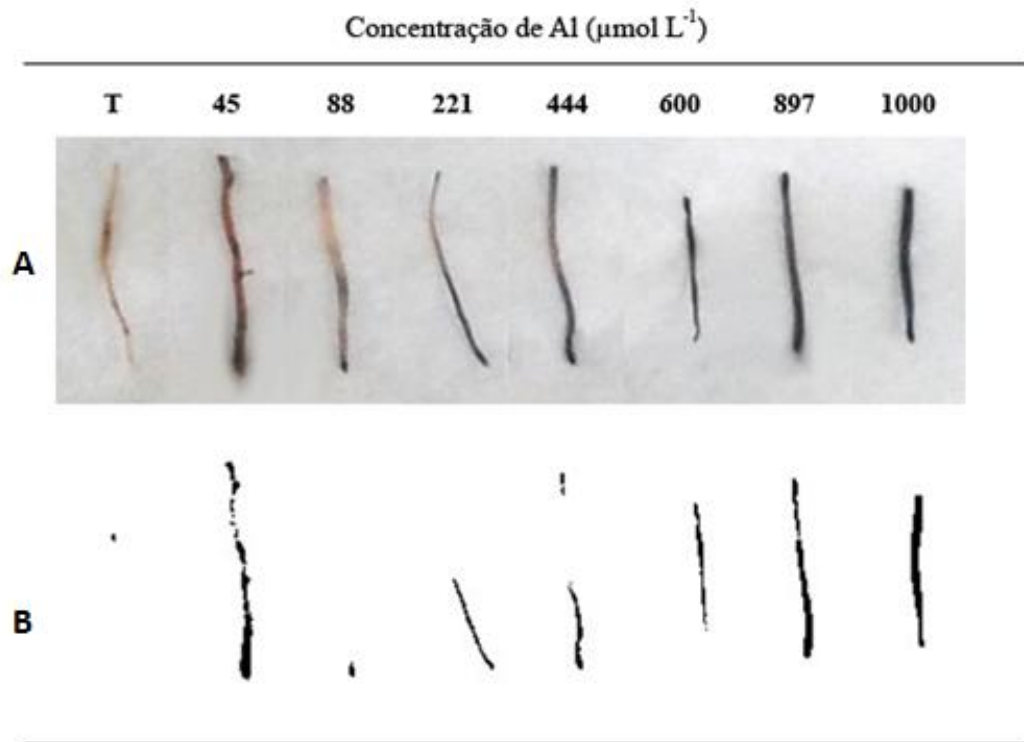


Figura 10. A) Raízes da cultivar CTC2 coradas com hematoxilina. B) Imagem binarizada das raízes utilizando o Software Safira.

A cultivar CTC14 mostrou-se tolerante ao acúmulo de Al, excluindo-o até a dose de $897 \mu\text{mol L}^{-1}$, com concentração apenas em regiões basais dos ápices caulinares. Na dose de $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentou acúmulo por todo ápice, e foi classificada como 7 (Figura 11).

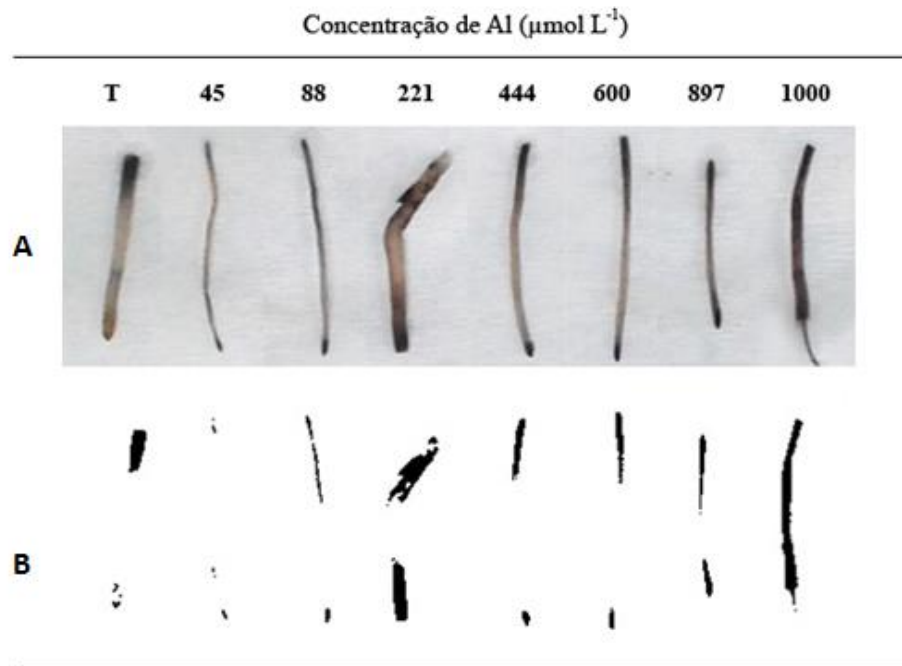


Figura 11. A) Raízes da cultivar CTC14 coradas com hematoxilina. B) Imagem binarizada das raízes utilizando o Software Safira.

A cultivar RB855453 apresentou acúmulo na região meristemática na dose de $897 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto esse acúmulo na cultivar RB966928 ocorreu na dose de $444 \mu\text{mol L}^{-1}$. A cultivar CTC2 mesmo inibindo o acúmulo de Al até a dose de $221 \mu\text{mol L}^{-1}$, apresentou acúmulo pela região meristemática a partir de $600 \mu\text{mol L}^{-1}$. A intensa coloração pela hematoxilina observada nessas cultivares pode ser a causa dos danos intensos que o acúmulo de Al promove na raiz, diferentemente do observado na cultivar CTC14, indicando boa capacidade de crescimento em Al (maior tolerância), atingindo alta intensidade na dose de $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$.

5.2 Fisiologia de folhas e raízes das cultivares selecionadas

5.2.2 Parâmetros fisiológicos

Foi possível observar a redução do volume de raízes e do crescimento radicular nas duas cultivares após sete dias de estresse (Figura 12). Na presença de alumínio, o desenvolvimento das raízes é prejudicado, essas, se tornam mais curtas, grossas e não apresentam alongamento radicular acentuado (KOCHIAN, 1995; MOSSOR-PIETRASZEWSKA, 2001; ZHENG & YANG, 2005).

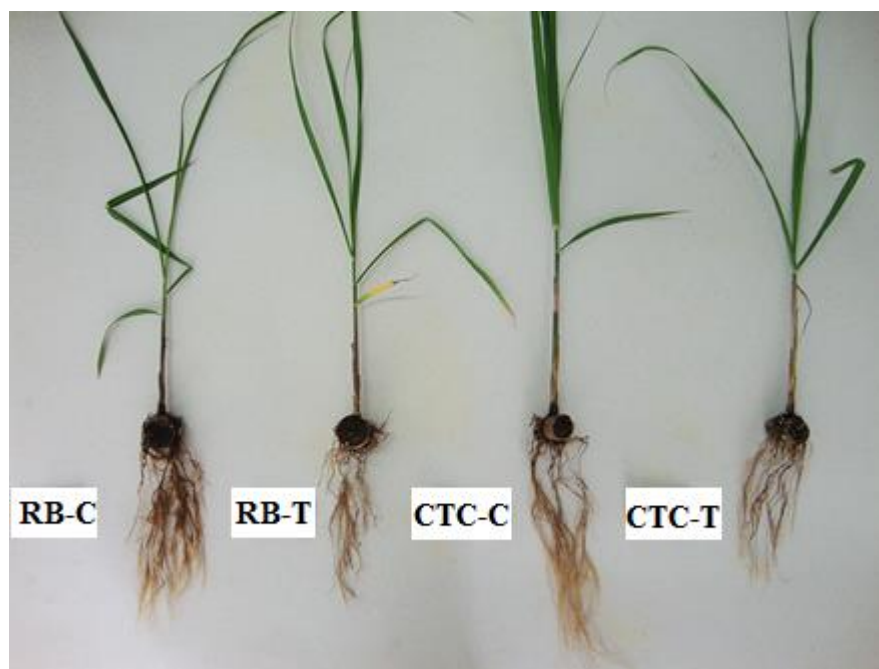


Figura 12. Desenvolvimento das raízes nas cultivares CTC2 e RB855453. Onde, RB-C = planta controle; RB-T = planta estressada; CTC-C = controle; e CTC-T = estressada.

Os parâmetros fisiológicos área foliar, potencial osmótico, concentração intercelular de CO_2 , temperatura foliar, taxa de transpiração, condutância estomática e taxa fotossintética foram avaliados levando em consideração as duas cultivares CTC2 e RB855453, bem como, as condições de estresse no quais as plantas foram submetidas, situação controle e estressada (concentração de $221\mu\text{mol L}^{-1}$ de Al) (Tabela 4).

Tabela 4. Teste de médias dos parâmetros fisiológicos avaliados nas cultivares de cana-de-açúcar CTC2 e RB855453, submetidas ao estresse por alumínio.

Tempo (horas)	Cultivar	Cond. ²	Área foliar (cm ²)		Potencial osmótico (ψ)		Ci ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)		Temperatura foliar (°C)		E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		gs ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		A ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	
			Médias	T.E ¹	Médias	T.E ¹	Médias	T.E ¹	Médias	T.E ¹	Médias	T.E ¹	Médias	T.E ¹	Médias	T.E ¹
48	CTC2	C	722,84a	A	-0,71a	A	153,50a	A	15,35a	A	2,96a	A	0,15a	A	20,08a	A
		T	595,54b		-0,71a		152,50a		15,25a		3,56a		0,16a		16,73a	
	RB 855453	C	388,16a	B	-0,75a	A	182,50a	A	18,25a	A	2,94a	A	0,18a	A	19,50a	A
		T	377,31a		-0,66a		168,25a		16,82a		3,34a		0,14a		14,89b	
72	CTC2	C	703,00a	A	-0,80a	A	83,75a	A	8,37a	A	3,44a	A	0,15a	A	21,75a	A
		T	642,76a		-1,06a		166,50a		16,65a		3,42a		0,11a		11,93b	
	RB 855453	C	494,96a	B	-0,86a	A	110,50a	A	11,05a	A	2,99a	A	0,13a	A	16,97a	B
		T	424,91a		-0,91a		154,25a		15,42a		3,01a		0,10a		11,50a	
96	CTC2	C	738,19a	A	-1,06b	A	104,00b	A	10,40b	A	3,77a	B	0,14a	A	19,77a	A
		T	589,46a		-0,91a		228,25a		22,82a		3,05b		0,09a		7,33b	
	RB 855453	C	472,86a	B	-0,96a	A	144,00a	A	14,40a	A	3,93a	A	0,20a	A	19,72a	A
		T	465,13a		-0,93a		235,50a		23,55a		4,05a		0,13a		8,67b	
168	CTC2	C	680,04a	A	-0,71a	A	156,00a	A	15,60a	A	3,49a	B	0,16a	A	16,82a	A
		T	543,96a		-1,00a		182,25a		18,22a		3,73a		0,15a		14,30b	
	RB 855453	C	450,41a	A	-0,96a	A	169,25a	A	16,92a	A	4,10a	A	0,24a	A	19,50a	A
		T	460,41a		-0,95a		158,00a		15,80a		4,48a		0,20a		18,99a	

¹T.E = Teste de média gerado pelo software Agroestat 1.1; *Médias seguidas de mesma letra não se diferenciam pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; Letra minúscula para diferenciar condição controle de estressada dentro de cada cultivar, e letra maiúscula para diferenciar as cultivares;

²Cond. = condição de planta controle (C) e planta estressada (T); Ci = Concentração intracelular de CO₂; E = Taxa de transpiração; gs = Condutância estomática; A = Taxa fotossintética.

A área foliar mensurada foi menor para as plantas submetidas ao estresse em ambas as cultivares, com diferença estatística significativa para as condições analisadas na cultivar CTC2 no tempo de 48 horas. Essa cultivar foi significativamente superior a cultivar RB855453 nos tempos de análise de 48, 72 e 96 horas, portanto, apresentou maior área foliar ao longo do estresse o que se comprova pelo aumento da taxa fotossintética observada nos tempos de 48 e 72 horas.

Após 48 horas de estresse, a média da área foliar apresentada pela cultivar CTC2 foi de 595,54 cm², superior a outra cultivar, com média de 377,31 cm². Ao sétimo dia de estresse, as plantas de CTC2 apresentaram média de 543,96 cm², o que corresponde a aproximadamente 83 cm² a mais do que a média aferida para as plantas da cultivar RB855453.

A redução da área foliar observada no presente trabalho corrobora os dados de Pincelli (2010), quando comparou a cultivar RB855453 com RB72454, SP81-3250 e SP83-2847 sob estresse hídrico. Desse modo, a redução da área foliar nessas cultivares sob diferentes estresses abióticos, pode implicar na interceptação de radiação solar (SANTOS; CARLESSO, 1998) levando a redução da taxa fotossintética (JAMIESON et al., 1995).

Houve diferença estatística entre as cultivares CTC2 e RB855453 no tempo de 72 horas de estresse por alumínio, sendo a primeira superior, com taxa de fotossíntese na situação sem estresse de 21,75 $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 11,93 $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na situação de estresse, diferente do observado para a segunda cultivar, com níveis respectivos de 16,97 $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 11,50 $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Entretanto, de modo geral, ambas as cultivares apresentaram diminuição da taxa fotossintética em reposta ao estresse por alumínio.

Os níveis de fotossíntese, condutância estomática e transpiração são características fisiológicas qualitativas que se correlacionam (SMIT; SINGLES, 2006), além disso, o alumínio absorvido pelas raízes interfere em diversos processos fisiológicos e bioquímicos da planta, como a fotossíntese (LEMOS FILHO, 1982). Com isso, o estresse promovido com o alumínio absorvido pelas raízes das cultivares CTC2 e RB855453, levou à redução da taxa fotossintética e a diminuição da condutância estomática nas duas cultivares. A cultivar RB855453 apresentou

aumento da taxa de transpiração nos quatro tempos de análise, diferente da cultivar caracterizada como tolerante (CTC2), que reduziu a transpiração nos tempos de 72 e 96 horas.

Vale ressaltar que a perda de água pode ser realizada via cuticular, lenticular e/ou estomática. Como a condutância estomática está sendo reduzida nas plantas submetidas ao estresse por alumínio, o aumento da taxa de transpiração pode ser explicado mediante diferentes níveis de perda de água pela cutícula e/ou lentícula nas duas cultivares.

O potencial osmótico na cultivar RB855453 praticamente se manteve constante, diferentemente do observado para a cultivar CTC2 que nos tempos de 72 e 168 horas de estresse passou de -0,8 e -0,71 para -1,06 e -1 Mpa, respectivamente.

Verifica-se que nos tempos de 72 e 96 horas de estresse, as cultivares apresentaram aumento nos níveis de concentração intercelular de CO_2 , bem como, aumento da temperatura foliar, com diferença estatística significativa para a cultivar CTC2 no tempo de 96 horas, onde a planta estressada apresentou aumento de 104,00 para 228,25 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de concentração intercelular, e de 10,4 para 22,8°C de temperatura foliar.

Os estômatos estão relacionados ao processo de perda de água (transpiração) (TAIZ; ZEIGER, 2009). Como a concentração interna de CO_2 foi superior nas plantas sob estresse das cultivares CTC2 e RB855453 nos tempos de 72 e 96 horas, e em 7 dias na cultivar CTC2, a atividade estomática diminuiu nessas plantas, visto que sob o estresse, a condutância estomática diminuiu nos tempos de 72, 96 e 168 horas.

Os estômatos estando fechados proporcionam a redução de níveis de CO_2 a ser absorvido e conseqüentemente leva a diminuição da taxa fotossintética das plantas estressadas (Figura 13).

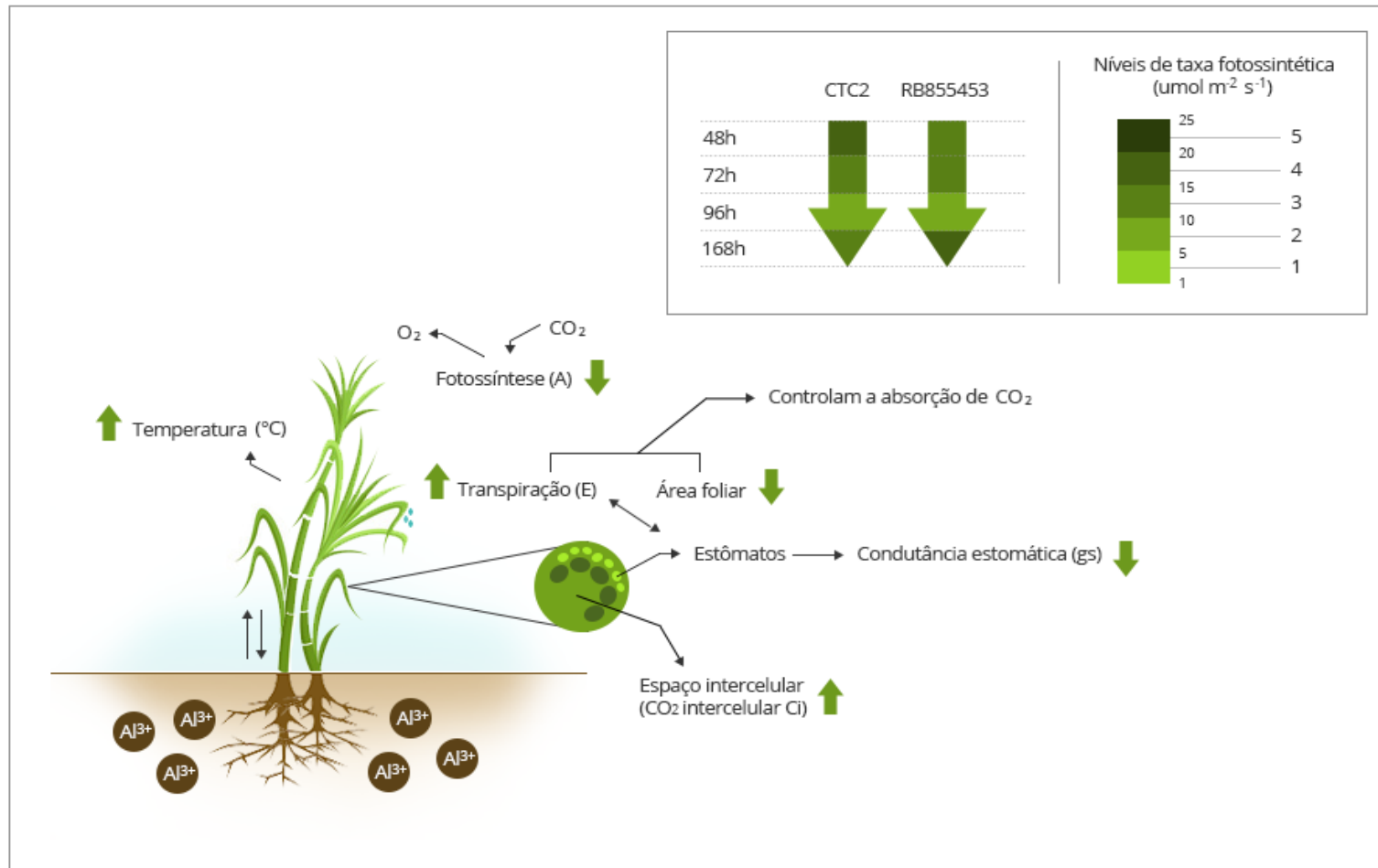


Figura 13. Representação esquemática para as alterações fisiológicas presentes em plantas das cultivares CTC2 e RB855453 submetidas a toxidez por alumínio (Fonte: autoria própria).

Segundo Rodrigues et al., (2009) muitas características observadas em cana-de-açúcar têm controle multigênico, portanto, a tolerância dessas cultivares podem mostrar diferentes respostas ao nível morfológico, fisiológico e molecular. Os mecanismos fisiológicos responsáveis pela tolerância à toxidez de alumínio podem variar entre espécies e cultivares, e provavelmente plantas tolerantes devem ser capazes de prevenir a absorção de alumínio ou complexa-los após essa absorção (PARENTONI et al., 2001; FERREIRA et al., 2006).

Assim sendo, as cultivares CTC 2 e RB855453 apresentaram alguns resultados similares para as características fisiológicas analisadas, principalmente após 7 dias de estresse. No entanto, a primeira cultivar apresenta índices superiores para área foliar, taxas fotossintéticas (48 e 72 horas de estresse) e níveis de condutância estomática estáveis nos tempos de 48 horas e 7 dias, o que resulta em menor perda de água ao longo do estresse pela toxidez de alumínio.

5.2.3 Predição de alvos dos miRNAs

Os alvos dos miR164, miR159 e miR168 foram identificados com base na análise computacional, e verificou-se que esses miRNAs regulam respectivamente, a expressão do fator de transcrição NAC, fator de transcrição MYB, e o gene Argonaute 1 (AGO1) como apresentado nas Figuras 14, 15 e 16.

O miRNA168 tem sido relatado como regulador do alvo AGO1, proteína integrante do complexo RISC (VÁRALLYAY et al., 2010), e sua expressão associada a estresses abióticos (BALDRICH et al., 2014). O miR164 está relacionado a sinalização de auxina e desenvolvimento de raízes laterais (BALDRICH et al., 2014) e o miR159, também relacionado a estresses abióticos (REYES; CHUA, 2007; BURKLEW et al., 2012). Ainda em relação ao miR159, estudos relatam que fatores de transcrição MYB são alvos desse miRNA (RHOADES et al., 2002).

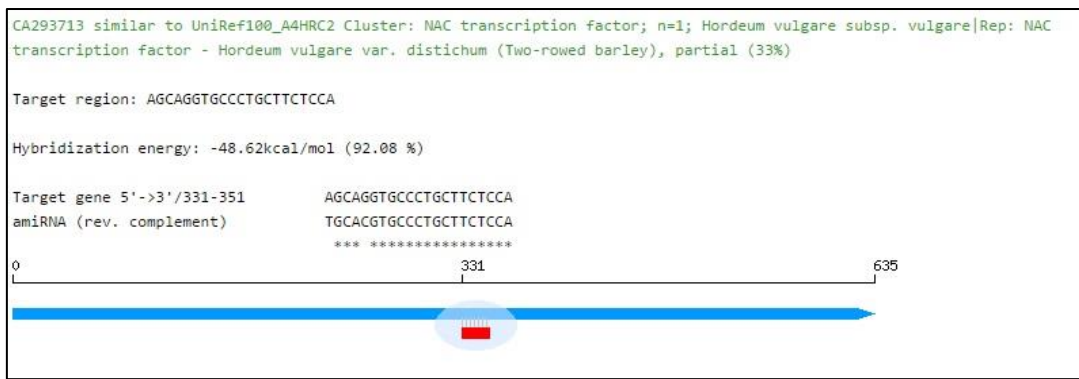


Figura 14. Alvo do miR164.

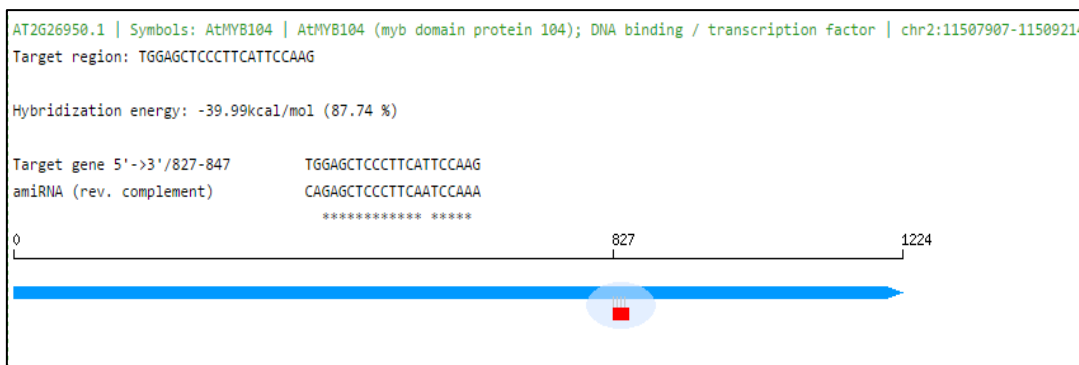


Figura 15. Alvo do miR159.

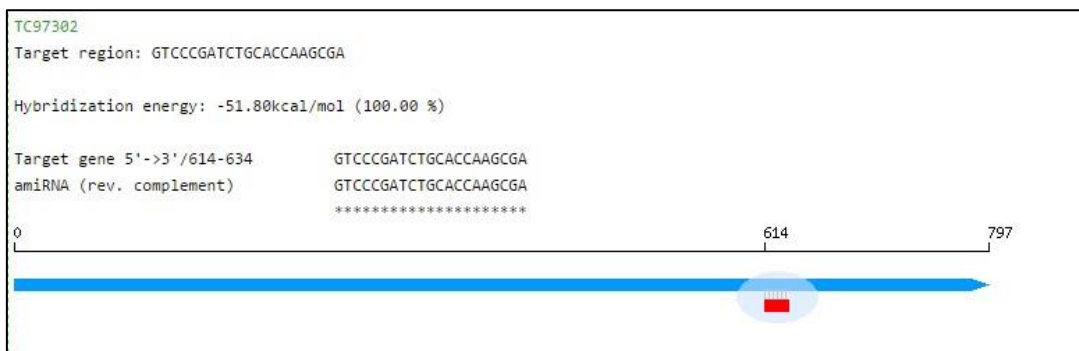


Figura 16. Alvo do miR168.

5.3 Expressão dos miRNAs

5.3.1 Expressão dos miRNAs em raízes

O miRNA 159 foi diferencialmente expresso nas raízes das cultivares CTC 2 e RB855453. Após 24 horas em contato com alumínio tóxico, esse miRNA foi

reprimido nas raízes e induzido nos demais tempos de estresse nas duas cultivares (Figura 17).

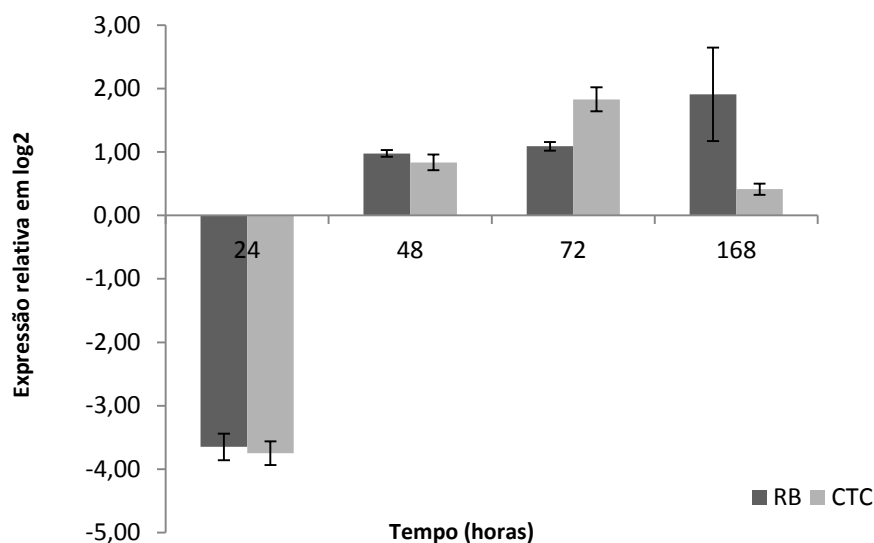


Figura 17. Expressão do miR159 nas raízes das cultivares CTC 2 e RB55453 nos diferentes tempos, sob estresse por alumínio.

Em *Arabidopsis* plantas submetidas ao tratamento com ABA (ácido abscísico) e estresse por seca, não apresentaram a expressão do fator de transcrição MYB101, contrastando com as plantas em ausência de estresse. Isso indica que a expressão desse fator foi regulada negativamente pelo miR159, ou seja, na ocorrência de estresse abiótico e presença do hormônio ABA, o miR159 atua sobre o fator de transcrição da classe MYB (REYES; CHUA. 2007).

A indução do miR159 nas raízes das cultivares CTC 2 e RB55453 pode estar relacionada a capacidade de cada genótipo na absorção dos íons de Al. O alumínio presente nas raízes irá aumentar os níveis de ABA (RENGEL, 1992), que por sua vez estão relacionados aos níveis de indução do miR159, consequentemente influenciando no crescimento da raiz e em processos fisiológicos como o fechamento estomático (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A indução do miR159 foi também constatada por Burklew et al. (2012) que trabalhou com concentrações de óxido de alumínio em tabaco, relatando expressão significativa desse miRNA com o aumento das concentrações de Al_2O_3 .

As cultivares CTC 2 e RB855453 apresentaram desenvolvimento radicular prejudicado ao longo do contato com alumínio tóxico. Após 7 dias de estresse, a cultivar RB855453 apresentou maior desenvolvimento de raízes laterais, o que comprova maior efeito tóxico dos íons absorvidos, visto que, os íons de Al podem promover destruição das células da região meristemática da raiz principal alterando a produção de hormônios que induzem o crescimento de raízes laterais (BRACCINI et al., 1998).

O miR164 foi induzido nas raízes de das duas cultivares durante todo o estresse, principalmente nas plantas da cultivar CTC 2, em 72 e 168 horas, conforme pode ser observado na Figura 18.

No presente trabalho, que envolve a toxidez por alumínio, a expressão do miR164 está regulando a expressão do fator de transcrição NAC, o que promove o menor desenvolvimento de raízes laterais na planta e inibe a sinalização de auxina, prejudicando o desenvolvimento da planta.

É possível observar uma relação existente entre os níveis de íons e a expressão de alguns miRNAs. Khraiwesh et al. (2012), relatando a expressão de alguns miRNAs em diferentes condições de estresse biótico e abiótico, descreve que o miR164 foi induzido em *Brassica napus* sob baixos níveis de sulfato ou em contato com metais pesados como Cd^{2+} .

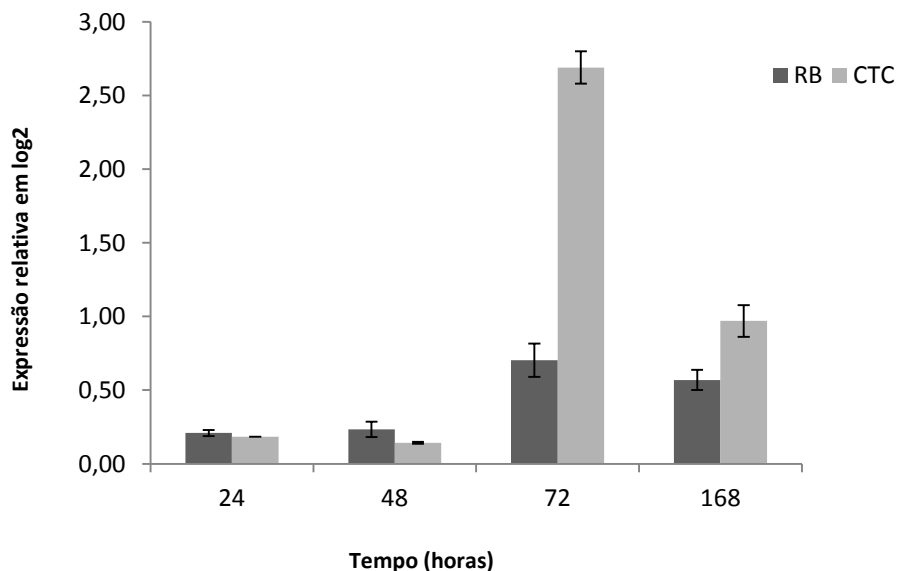


Figura 18. Expressão do miR164 nas raízes das cultivares CTC 2 e RB855453 nos diferentes tempos, sob estresse por alumínio.

Na cultivar CTC 2, o miR168 apresenta-se menos induzido ao longo do estresse em relação a cultivar RB855453 (Figura 19).

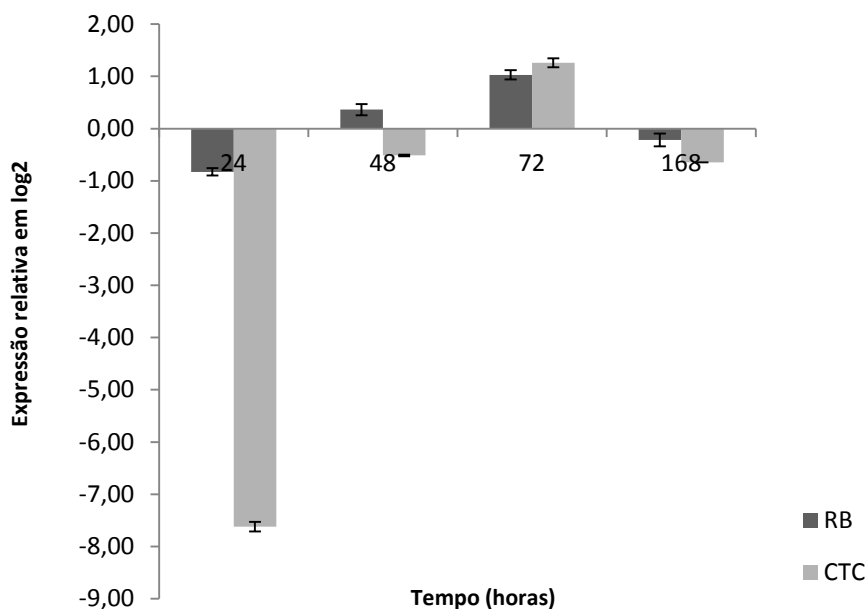


Figura 19. Expressão do miR168 nas raízes das cultivares CTC 2 e RB855453 nos diferentes tempos, sob estresse por alumínio.

No trabalho de LIU et al. (2008), o miR168 foi induzido em *Arabidopsis* em situações de estresse salino, seca e baixa temperatura, assim como, Khraiwesh et al. (2012), relataram a indução do miR168 em *Arabidopsis thaliana* e *Zea mays* quando submetidas ao estresse salino, em *Arabidopsis thaliana* em estresse por seca, bem como, em *Triticum aestivum* em estresse por calor, esse miRNA foi reprimido nas cultivares CTC 2 e RB855453 de *Saccharum sp.* em resposta ao alumínio após 24 horas de estresse e induzido após 3 dias.

Embora não se tenha muito conhecimento sobre a relação da AGO1 com estresses abióticos, sabe-se que essa proteína participa do complexo RISC (RNA induced silencing complex), que é um processo de silenciamento gênico pós-transcricional, onde esse complexo direciona a inibição da tradução ou clivagem de uma sequência específica de mRNAs complementares (HUTVAGNER; ZAMORE, 2002; TOMARI et al., 2004). Existem evidências de que o processo de silenciamento de RNA é um mecanismo natural de defesa contra vírus, desse modo, alguns vírus codificam proteínas que levam a supressão da via de silenciamento (MALLORY et al., 2001).

Tendo em vista as informações sobre o processo de silenciamento e mecanismos de supressão, Mallory e Vaucheret (2009) desenvolveram uma construção com o fragmento genômico AGO1 para transformar *Arabidopsis* e averiguar o efeito da expressão e conseqüentemente o desenvolvimento dos mutantes. Observaram que mutantes *ago1* apresentaram deficiências no desenvolvimento, diferente do observado para o mutante deficiente em PTGS (silenciamento gênico pós-transcricional) denominado *rdr6*, sugerindo desse modo, que as respostas fisiológicas observadas surgem a partir da co-supressão de AGO1. Segundo os autores a clivagem de AGO1 dirigida por miR168 facilita a co-supressão de AGO1.

Portanto, é provável que a ação do miR168 sobre AGO1 esteja influenciando no desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar, considerando que após 72 horas de estresse, em ambas as cultivares, o miR168 foi induzido (maior nível para a CTC 2).

6. CONCLUSÕES

O screening indicou que dentre as cultivares avaliadas, o genótipo CTC-2 é o mais tolerante e o RB855453 o mais sensível em altas concentrações de alumínio.

O miRNA164 está induzido em ambas as cultivares o que implica na regulação negativa do fator de transcrição NAC resultando na inibição da sinalização da auxina e promovendo o desenvolvimento das raízes laterais.

O miRNA159 está induzido nas cultivares após 48 horas de estresse. Regula o fator de transcrição MYB e influencia provavelmente nos níveis de ABA, o que resulta em alterações no desenvolvimento vegetal, como redução do crescimento foliar.

Relacionado ao processo de silenciamento gênico, o miRNA168, regula o gene AGO1 e está diferencialmente expresso ao longo do estresse, promovendo possivelmente a co-supressão de AGO1 e consequente alterações fisiológicas e morfológicas nas plantas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, J.C.; MALDONADO JR., W. AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Versão 1.0. Jaboticabal: Departamento de Ciências Exatas, 2010.

ALMEIDA, A. A. S., MONTEIRO, F. A., JANK, L. Avaliação de *Panicum maximum jacq.* para tolerância ao alumínio em solução nutritiva. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24, 2000.

BALDRICH, P.; KAKAR, K.; SIRÉ, C.; MORENO, A. B.; BERGER, A.; GARCÍA-CHAPA, M.; LÓPEZ-MOYA, J. J.; RIECHMANN, J. L.; SEGUNDO, B. S. Small RNA profiling reveals regulation of Arabidopsis miR168 and heterochromatic siRNA415 in response to fungal elicitors. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1083, 2014.

BHALERAO, S.A.; PRABHU, D.V. Aluminium Toxicity in Plants - A Review. *Journal of Applicable Chemistry*, 2(3): 447-474, 2013.

BONNET, E.; DE PEER, Y. V.; ROUZÉ, P. The small RNA world of plants – Review. *New Phytologist*, 171:451–468, 2006.

BRACCINI, M. C. L.; MARTINEZ, H. E. P.; PEREIRA, P. R. G.; SAMPAIO, N. F.; SILVA, E. A. M. Tolerância de genótipos de cafeeiro ao alumínio em solução nutritiva. Crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular. *Revista Bras. Ciência Solo*, v. 22, p. 435-442, 1998.

BURKLEW, C.E.; ASHLOCK, J.; WINFREY, W.B.; ZHANG, B. Effects of Aluminum Oxide Nanoparticles on the Growth, Development, and microRNA Expression of Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *PLoS ONE*, 7(5): e34783, 2012.

CANÇADO, G.M.A., ROSA-JUNIOR, V.E.D., FERNANDEZ, J.H., MARON, L.G., JORGE, R.A., MENOSSE, M. Glutathione S-transferase and aluminum toxicity in maize. *Funct. Plant Biol*, 32: 1045-1055, 2005.

CANÇADO, G.M.A.; NOGUEIRA, F.T.S.; CAMARGO, S.R.; DRUMMOND, R.D.; JORGE, R.A. & MENOSSE, M. Gene expression profiling in maize roots under aluminum stress. *Biologia Plantarum*, 52:475-485, 2008.

CARLIN, S. D.; RHEIN, A. F. L.; SANTOS, D. M. Efeito simultâneo da deficiência hídrica e do alumínio tóxico no solo na cultivar IAC91-5155 de cana-de-açúcar. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, n. 2, p. 553-564, 2012.

CARLSBECKER, A.; LEE, J.Y.; ROBERTS, C. et al. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, 465 (7296): 316–321, 2010.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, A.M.C.; ULIAN, E.C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. *Trop Plant Biol*, 4(1):62-89, 2011.

COLLINS, N.C., SHIRLEY, N.J., SAEED, M., PALLOTTA, M., GUSTAFSON, J.P. An ALMT1 gene cluster controlling aluminium (Aluminum) tolerance at the Alt4 locus of rye (*Secale cereale L.*). *Genetics*, 179: 669-682, 2008.

COX, M., HOGARTH, M., SMITH, G. Cane breeding and improvement. In "Manual of cane growing", M Hogarth, P Allsopp, eds. Bureau of Sugar Experimental Stations, Indooroopilly, Australia, pp 91-108, 2000.

DRUMMONT, R.D., GUIMARÃES, T.C., FELIX, J., NINAMANGO-CÁRDENAS, F.R., CARNEIRO, N.P., PAIVA, E., MENOSSE, M. Prospecting sugarcane genes involved in aluminum tolerance. *Genetics and Molecular Biology*, 24(1-4), 221-230, 2001.

EZAKI, B., SUZUKI, M., MOTODA, H., KAWAMURA, M., NAKASHIMA, S., MATUMOTO, H. Mechanism of gene expression of Arabidopsis glutathione S-transferase, *AtGST1* and *AtGST11* in response to aluminum stress. *Plant Physio*, 134:1672–1682, 2004.

FERREIRA, T.H., GENTILE, A., VILELA, R.D., COSTA, G.G.L., DIAS, L.I., ET AL. MicroRNAs Associated with Drought Response in the Bioenergy Crop Sugarcane (*Saccharum spp.*). *PLoS ONE*, 7(10): e46703, 2012.

FERREIA, R. P.; MOREIRA, A.; RASSINI, J. B. Toxidez de alumínio em culturas anuais. *Embrapa Pecuária Sudeste*, 35p. 2006.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agrônomo de Campinas no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. A. (Org.). *Cana-de-Açúcar*. Campinas: Instituto Agrônomo, p.31-44, 2010.

FREITAS, F. A.; KOPP, M. M.; SOUSA, R. O.; ZIMMER, P. D.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.1, p.72-79, 2006.

GUO, H.S., XIE, Q., FEI, J.F., CHUA, N.H. MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor NAC1 to Down regulate Auxin Signals for Arabidopsis Lateral Root Development. *The Plant Cell*, Vol. 17, 1376–1386, 2005.

GUPTA, N.; GAURAV, S.S.; KUMAR, A. Molecular Basis of Aluminium Toxicity in Plants: *A Review American Journal of Plant Sciences*, 4, 21-37, 2013.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; BERTAN, I.; SILVA, J. A.G.; SCHMIDT, D.A.M.; VALÉRIO, I.P.; MAIA, L.C.; FONSECA, D.A.R.; REIS, C.E.S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 28, n. 2, p. 219-228, 2007.

HE, H., HE, L., GU, M. Role of microRNAs in aluminum stress in plants. *Plant Cell Rep*, 2014.

HUTVAGNER, G.; ZAMORE, P. D. A microRNA in a multiplet turnover RNAi enzyme complex. *Science*, v. 297, p. 2056-60, 2002

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS - IAC. Cultivares IAC. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/cultivares>>. Acesso em: 30 jan. 2014.

JAMIESON, P. D. et al. Effects of water deficits on evapotranspiration from barley. *Agricultural and Forest Meteorology*, New Zealand, v. 76, p. 41-58, 1995.

JASINSKI, S., VIALETTE-GUIRAUD, A.C.M., SCUTT, C.P. The evolutionary developmental analysis of plant microRNAs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365(1539): 469–476, 2010.

KHRAIWESH, B.; ZHU, I. K.; ZHU, J. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *BBA – Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1819, n. 2, p. 137-148, 2012.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 46, p. 237-260, 1995.

LANDELL, M.G.A. Comportamento da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) frente a níveis de alumínio, em solução nutritiva. Jaboticabal: UNESP/FCAV. 117p, 1989.

LEE, R.C., FEINBAUM, R.L., AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75:843-854, 1993.

LEMOES FILHO, J. P. Efeito do alumínio sobre os teores de alguns elementos minerais, sobre a atividade de certas oxidases em sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Dissertação de Mestrado*. Viçosa: UFV, 1982. 46p.

LIMA, J.C., ARENHART, R.A., MARGIS-PINHEIRO, M., MARGIS, R. Aluminum triggers broad changes in microRNAs expression in rice roots. *Genet. Mol. Res*, 10 (4): 2817-2832, 2011.

LIU, H. H.; TIAN, X.; LI, Y. J.; WU, C. A.; ZHENG, C. C. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, v. 14, n. 5, p. 836-843, 2008.

MALLORY, A.C., BARTEL, D.P., AND BARTEL, B. MicroRNA directed regulation of *Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17* is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell*, 17, 1360-1375, 2005.

MALLORY, A.C., DUGAS, D.V., BARTEL, D.P., AND BARTEL, B. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of

adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Current Biology*, 14, 1035-1046, 2004.

MALLORY, A. C.; ELY, L.; SMITH, T. H.; MARATHE, R.; ANANDALAKSMI, R.; FAGARD, M.; VAUCHERET, H.; PRUSS, G.; BOWMAN, L.; VANCE, V. B. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell*, v. 13, p. 571-83, 2001.

MALLORY, A. C.; VAUCHERET, H. Argonaute 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Rep.*, v. 10, n. 5, p. 521-526, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Anuário Estatístico da Agroenergia, 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/anuario_agroenergia_web_2012.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2014.

MIRBASE: THE MICRORNA DATABASE. Disponível em: <<http://www.mirbase.org>>. Acesso em: 05 jan. 2014.

MOSSOR-PIETRASZEWSKA, T. Effect of aluminium on plant growth and metabolismo. *Acta Biochimica Polonica*, v. 48, n. 3, p. 673-686, 2001.

ORTIZ-MOREA, F.; VICENTINI, R., et al. *Exp. Bot.*, 64 (8): 2307-2320, 2013.

OVERVOORDE, P., FUKAKI, H., BEECKMAN, T. Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2:a001537, 2010.

PARENTONI, S. N.; ALVES, V. M. C.; MILACH, S. K.; CANÇADO, G. M. A.; BAHIA FILHO, A. F. C. B. Melhoramento para tolerância ao alumínio como fator de adaptação a solos ácidos. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.). *Recursos genéticos & melhoramento*. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 783-851.

PARDO, J.M. Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol 21, 185–196, 2010.

RENGEL, Z. Role of calcium in aluminum toxicity. *New Phytol.*, n. 121, p. 499-513, 1992.

REYES, J. L.; CHUA, N. H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal*, v. 49, p. 592–606, 2007.

RHOADES, M. W.; REINHART, B. J.; LIM, L. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, B.; BARTEL, D. P. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, v. 110, p. 513–520, 2002.

RODRIGUES F. A., DA GRACA J.P., DE LAIA M.L., NHANI A., GALBIATI J.A., *et al.* Sugarcane genes differentially expressed during water deficit. *Biol Plantarum*, 55:43–53, 2011.

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

RUBIO-SOMOZA, I.; WEIGEL, D. Coordination of Flower Maturation by a Regulatory Circuit of Three MicroRNAs. *PLoS Genet*, 9(3): e1003374, 2013.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P.J. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta*, Vol. 196, pp. 103-110, 2003.

SALDANHA, E.C.M.; ROCHA, A.T. DA; OLIVEIRA, E.C.A. DE; NASCIMENTO, C.W.A. DO; FREIRE, F.J. Uso do gesso mineral em Latossolo cultivado com cana-de-açúcar. *Caatinga*, v.20, 2007.

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

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v.1, n.3, p.231-233, 1975.

SILVA, I. R.; SMYTH T. J.; MOXLEY, D. F.; CARTER, T. E.; ALLEN, N. S.; RUFTY, T. W. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection

using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiology*, Rockville, v.123, n.2, p.543-552, 2000.

SMITH, D.M.; INMAN-BAMBER, N.G.; THORBURN, P.J. Growth and function of the sugarcane root system. *Field Crops Research*, v.92, p.169-183, 2005.

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

SREENIVASAN, T.V., AHLOOWALIA, B.S., HEINZ, D.J. Sugarcane improvement through breeding. *Cytogenetics*, ed. Elsevier, Amsterdam, pp 211-253, 1987.

TAIZ, L, ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 4ª Ed., 2009.

TOMARI, Y.; MATRANGA, C.; HALEY, B.; MARTINEZ, N.; ZAMORE, P.D. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, v. 306, p.1377-80, 2004.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR - UNICA. Exportação anual de etanol pelo Brasil, 2013. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=23>>. Acesso em: 25 abr. 2016.

UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA – UDOP. Disponível em: <http://www.udop.com.br/index.php?item=comercio_exterior >. Acesso em: 25 abr. 2016.

VÁRALLYAY, E.; VÁLÓCZI, A.; ÁGYI, A.; BURGÁN, J.; HAVELDA, Z. Plant virus mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *The EMBO Journal*. v. 29, p. 3507-3519, 2010.

VETTORE, A.L., SILVA, F.R., KEMPER, E.L., SOUZA, G.M., et al. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Res*,13:2725-2735, 2003.

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Brazilian Journal Plant Physiology*, v. 17, p 129-143, 2005.

WANG, W.; VINOCCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, v. 218, p. 1-14, 2003.

WATT, D. Aluminum-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54, No. 385, pp. 1163-1174, 2003.

XIE, K.; SHEN, J.; HOU, X.; YAO, J.; LI, X.; XIAO, J.; XIONG, L. Gradual Increase of miR156 Regulates Temporal Expression Changes of Numerous Genes during Leaf Development in Rice. *Plant Physiology*, Vol. 158, pp. 1382–1394, 2012.

ZENG, Q.Y., YANG, C.Y., MA, Q.B., LI, X.P., DONG, W.W., NIAN, H. Identification of wild soybean miRNAs and their target genes responsive to aluminum stress. *BMC Plant Biolog.*, 12:182, 2012.

ZHANG, B., PAN, X., CANNON, C.H., COBB, G.P., ANDERSON, T.A. Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J*, 46(2):243-59, 2006.

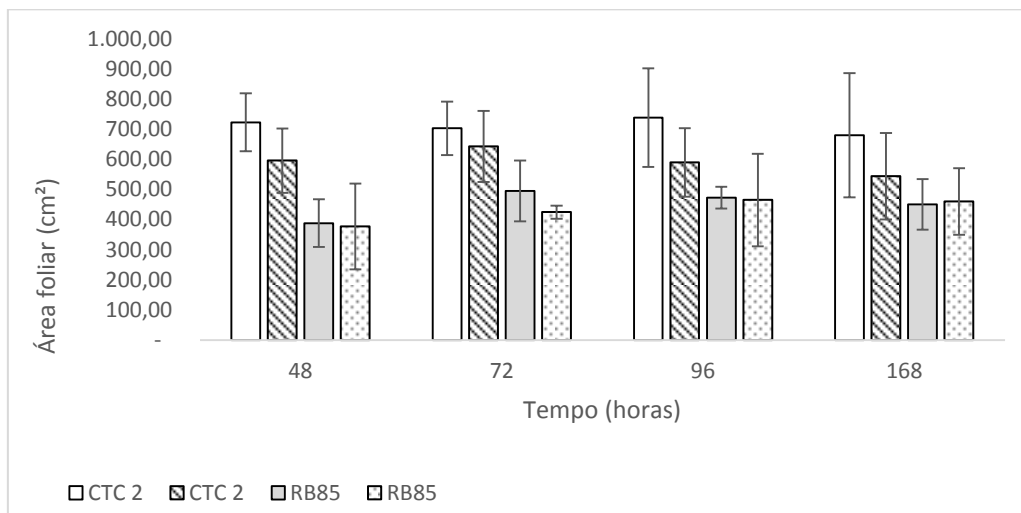
ZHANG, G., ARCHAMBAULT, D.J., AND TAYLOR, G.J. Effects of protein synthesis inhibitors on uptake of aluminum in aluminum-resistant and aluminum-sensitive cultivars of wheat. *J. Plant Physiol*, 147: 457-463, 1995.

ZHENG, S. J.; YANG, J. L. Target sites of aluminum phytotoxicity. *Biologia Plantarum*, v. 49, n. 3, p. 321-331, 2005.

8. APÊNDICES

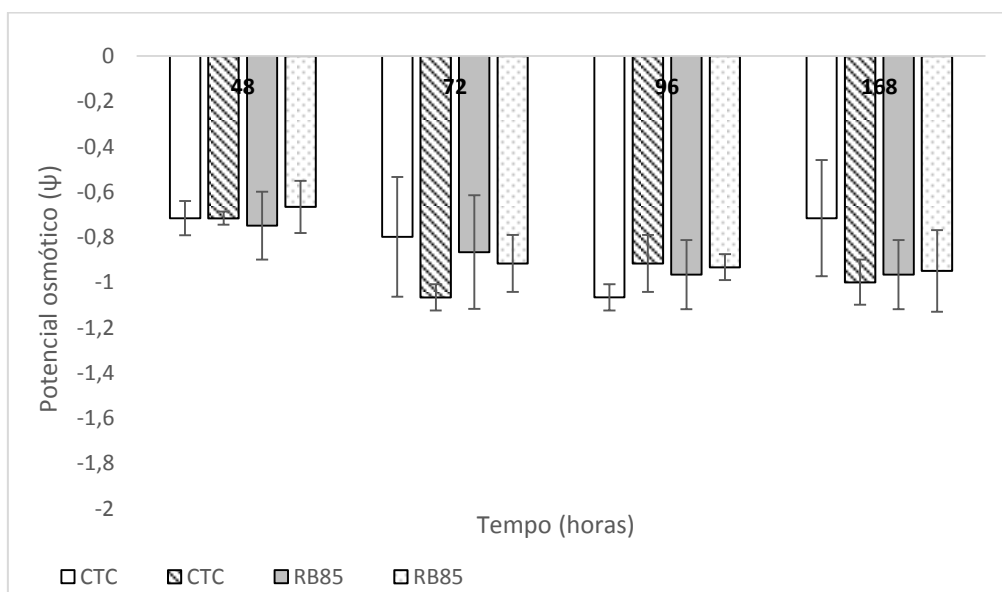
Apêndice 1

Área foliar (cm²) das cultivares CTC 2 e RB855453 nas condições controle e tratamento, em estresse por alumínio.



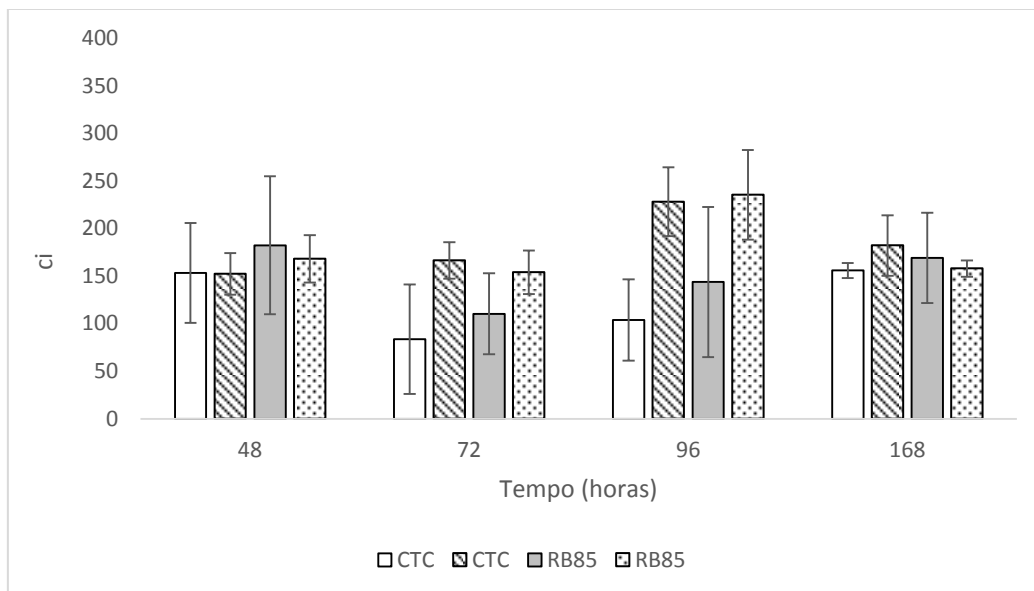
Apêndice 2

Potencial osmótico (ψ) das cultivares CTC 2 e RB855453 nas condições controle e tratamento, em estresse por alumínio.



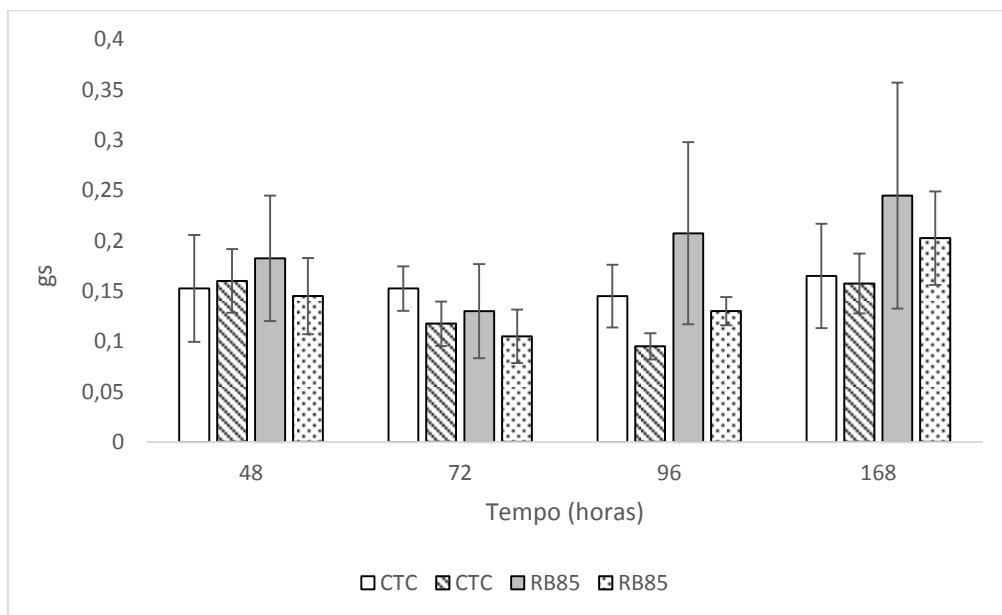
Apêndice 3

Concentração intercelular de CO_2 ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) das cultivares CTC 2 e RB855453 nas condições controle e tratamento, em estresse por alumínio.



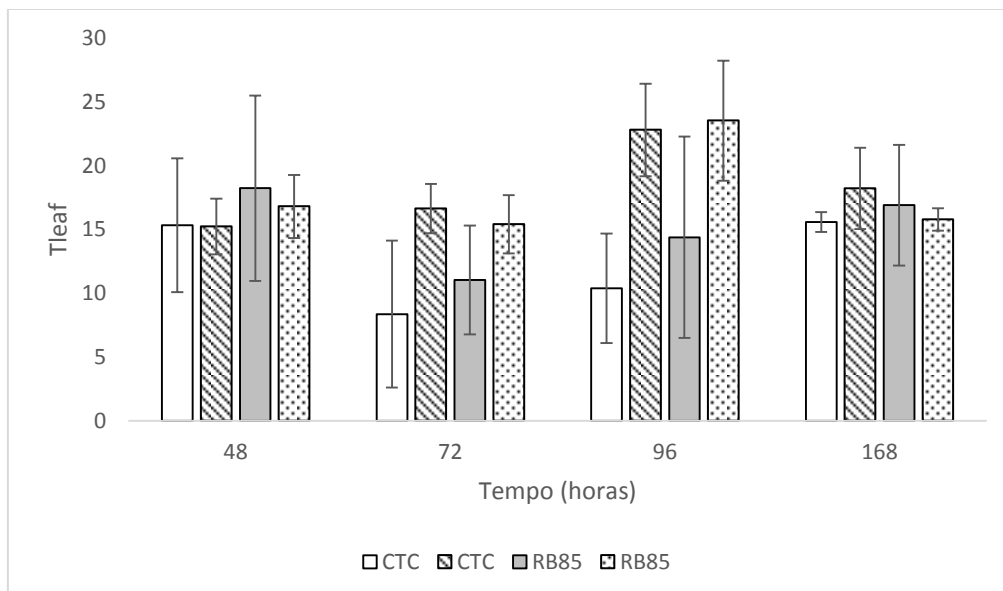
Apêndice 4

Condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) das cultivares CTC 2 e RB855453 nas condições controle e tratamento, em estresse por alumínio.



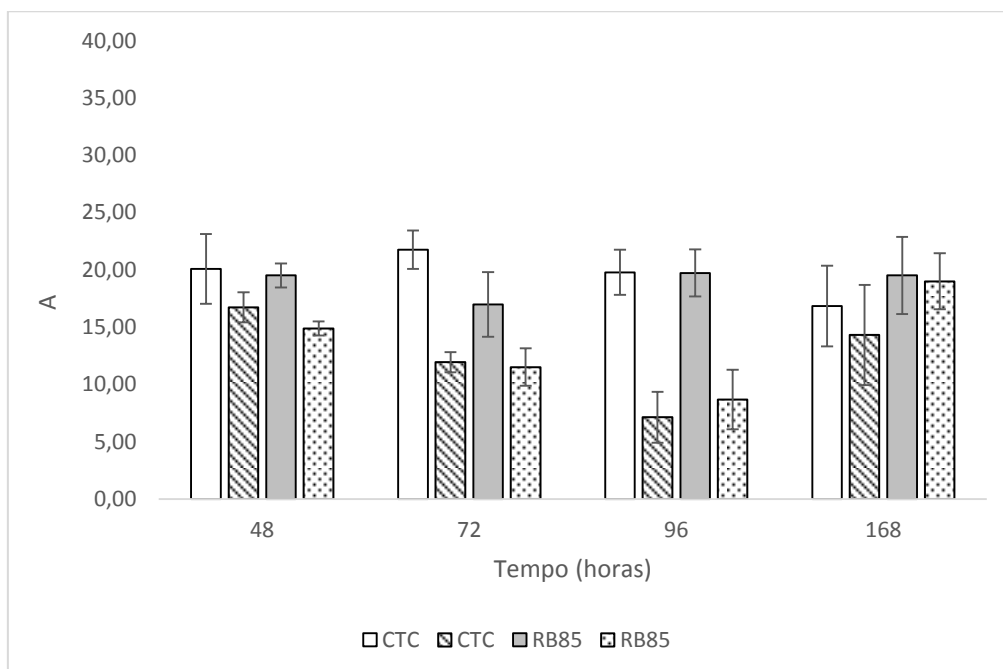
Apêndice 5

Temperatura da folha (°C) das cultivares CTC 2 e RB855453 nas condições controle e tratamento, em estresse por alumínio.



Apêndice 6

Taxa fotossintética ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) das cultivares CTC 2 e RB855453 nas condições controle e tratamento, em estresse por alumínio.



Apêndice 7

Taxa de transpiração ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) das cultivares CTC 2 e RB855453 nas condições controle e tratamento, em estresse por alumínio.

