

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo será disponibilizado somente a partir de 20/02/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ANÁLISE *in silico* DO GENE “LIPID TRANSFER PROTEIN”
(LTP) DE CANA-DE-AÇÚCAR E FUNCIONAL EM
TRANSFORMANTES DE (*Nicotiana tabacum*)**

Renan Gonçalves da Silva

Biólogo

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ANÁLISE *in silico* DO GENE “LIPID TRANSFER PROTEIN”
(LTP) DE CANA-DE-AÇÚCAR E FUNCIONAL EM
TRANSFORMANTES DE (*Nicotiana tabacum*)**

Renan Gonçalves da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti

Dissertação 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

Silva, Renan Gonçalves da
S586a Análise *in silico* do gene "Lipid Transfer Protein" (LTP) de cana-de-açúcar e funcional em transformantes de (*Nicotiana tabacum*) / Renan Gonçalves da Silva. -- Jaboticabal, 2017
68 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Sonia Marli Zingaretti
Banca examinadora: Janete Aparecida Desiderio, Juliana da Silva
Coppede
Bibliografia

1. *Agrobacterium*. 2. Clonagem. 3. Déficit hídrico. 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.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ANÁLISE *in silico* DO GENE "LIPID TRANSFER PROTEIN" (LTP)
DE CANA-DE-AÇÚCAR E FUNCIONAL EM TRANSFORMANTES DE
(*Nicotiana tabacum*)

AUTOR: RENAN GONÇALVES DA SILVA

ORIENTADORA: SONIA MARLI ZINGARETTI

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

Profa. Dra. SONIA MARLI ZINGARETTI

Departamento de Biologia Molecular / Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP - Ribeirão Preto

Profa. Dra. JANETE APARECIDA DESIDERIO

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. JULIANA DA SILVA COPPEDE

UNAERP / Ribeirão Preto, SP

Jaboticabal, 20 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RENAN GONÇALVES DA SILVA – Nascido em 09 de novembro de 1989, no município de Guaraçaí, estado de São Paulo. Ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em março de 2009. Foi bolsista de iniciação científica pela FAPESP por dois anos consecutivos; bolsista de iniciação à docência pela CAPES e bolsista do programa Ciência sem Fronteiras pelo CNPq, realizando intercâmbio de um ano na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Portugal. Adquiriu experiência internacional sendo estagiário no ‘Sexual Plant Reproduction and Development Laboratory’ (pertencente ao Center for Biodiversity, Functional and Integrative Genomics). Em julho de 2014 obteve o título de Biólogo. Iniciou o curso de mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) em agosto de 2014. Foi bolsista FAPESP-Ms por quinze meses, desenvolvendo pesquisa na área de biotecnologia, biologia molecular, fisiologia e genética de plantas.

“A dúvida é o princípio da sabedoria”

Aristóteles

Dedico,

À minha avó,

Adelina Néspoli Gonçalves (*in memorian*),

**pois ela me proporcionou toda a educação e inspiração necessária
para ser a pessoa que me tornei.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me amparado nos momentos difíceis e por colocar no meu caminho pessoas especiais.

Aos meus pais, Maria das Graças Gonçalves Silva e Nivaldo Ribeiro da Silva, que mesmo diante das dificuldades e divergências, não mediram esforços para me ajudar quando foi preciso.

À minha orientadora, Sonia Marli Zingaretti, pela amizade, compreensão, orientação e principalmente por ser a mediadora dos conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado.

Aos meus amigos de longa data, Janaina Rodrigues, Michele Ennes, Maiara Cornacini, Patrícia de Barros, Laíza Silva, Priscila de Barros, Gilberto Alkimin e Paulo Lopes, que me apoiaram em diversos momentos, com palavras e atitudes de incentivo e inspiração.

Aos amigos e colaboradores de pesquisa, Tiago Matheus, Juliana Coppede e Simone Torres, pelos bons momentos e apoio no desenvolvimento do trabalho.

Ao Lucas Corrêa, pela amizade e apoio em momentos que se fez necessário um ombro amigo.

Aos funcionários da UNAERP e UNESP-FCAV, pela disponibilidade e boa vontade em colaborar com o desenvolvimento da pesquisa.

À FAPESP pela bolsa de Mestrado (Processo 2014/24464-9) concedida.

E não menos importante, agradeço à Luana Mantovanini, Janeth Pinheiro e Joice Leite, por terem me acolhido tão grandiosamente em Ribeirão Preto. Foram irmãs, amigas, confidentes. Ajudaram-me em diversos momentos, fazendo com que eu não desistisse de um sonho. Contribuíram imensuravelmente para que eu alcançasse os resultados possíveis e amadurecesse como ser humano.

À todos vocês, minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1 Cana-de açúcar	02
2.2 Estresse hídrico	03
2.3 Identificação e Caracterização de genes	05
2.4 Caracterização <i>in silico</i> e proteína LTP.....	07
2.5 Transformação genética de plantas	09
3. OBJETIVO.....	11
3.1 Objetivo geral	11
3.2 Objetivos específicos	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Obtenção dos clones e sequenciamento	12
4.2 Análise <i>in silico</i> do gene <i>LTP</i>	12
4.3 Clonagem molecular	13
4.3.1 Preparo do vetor de transformação	13
4.3.1.1 Preparação de células competentes de <i>E. coli</i>	15
4.3.1.2 Eletroporação de células competentes com os vetores plasmidiais	16
4.3.1.3 Isolamento de plasmídeos recombinantes.....	17
4.3.1.4 Amplificação do gene clonado por PCR.....	17
4.4 Transformação genética de <i>A. tumefaciens</i>	17
4.5 Transformação genética de tabaco	18
4.6 Confirmação dos transformantes	19
4.7 Bioensaio de estresse hídrico com os transformantes	19
4.8 “Screening” dos transformantes	20
4.9 Análise estatística	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22

5.1 Obtenção e sequenciamento do gene <i>LTP</i>	22
5.2 Análise da sequência de <i>LTP</i>	24
5.3 Caracterização <i>in silico</i> do gene <i>LTP</i> e proteína.....	26
5.4 Expressão de <i>LTP</i> em resposta à seca	31
5.5 Obtenção do cassete de expressão pCAMBIA23.01:: <i>LTP</i>	32
5.6 Transformação de tabaco e confirmação de transformantes	37
5.7 “Screening” dos transformantes	41
5.7.1 Comprimento da raiz – no período de estresse	41
5.7.2 Capacidade de readaptação das plantas.....	44
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
8. APÊNDICES.....	61
9. ANEXOS	66

ANÁLISE *in silico* DO GENE “LIPID TRANSFER PROTEIN” (LTP) DE CANA-DE-AÇÚCAR E FUNCIONAL EM TRANSFORMANTES DE (*Nicotiana tabacum*)

RESUMO – A grande expansão da cultura de cana-de-açúcar pelo território brasileiro leva à necessidade do desenvolvimento de cultivares melhoradas e adaptadas às diferentes condições de clima a que são submetidas. Os estresses bióticos e abióticos são fatores que afetam a produtividade de uma cultura e entre esses, o estresse hídrico assume grande importância em função do regime de chuvas e do aumento de temperatura iminente nos próximos anos. Analisar a expressão de genes em plantas submetidas a estresses pode contribuir de forma expressiva para elucidar as rotas de defesa das plantas, contribuindo sobremaneira para o melhoramento da cultura e o desenvolvimento de novas variedades. O projeto teve como objetivo obter transformantes de *Nicotiana tabacum in vitro* com o gene *LTP* (*Lipid Transfer Protein*) e avaliar sua funcionalidade em relação ao estresse por deficiência hídrica, em casa de vegetação por hidroponia. Feita a seleção da EST com base em resultados anteriores obtidos pelo grupo de pesquisa, posterior análise em bancos de dados, realizou-se a aquisição do clone no Centro de Estocagem de Genes (BCCCenter) e o re-sequenciamento para comprovar sua identidade. Estudos *in silico* foram realizados através da utilização de softwares de bioinformática e a análise da função do gene foi realizada a partir da transformação genética de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*. Seis transformantes de *N. tabacum* com o inserto de interesse *LTP* foram obtidos e testados quanto à tolerância ao déficit hídrico, pela indução por diferentes concentrações de manitol. As plantas de tabaco transformantes demonstraram melhor desempenho fenotípico em relação à planta não transformada e boa capacidade de readaptação após o estresse. A geração T₁ dessas plantas devem ser utilizadas em estudos para comprovação biológica e funcional da ação do gene inserido, através da técnica de Real Time qPCR.

Palavras-chave: *Agrobacterium*, clonagem, déficit hídrico.

ANALYSIS *in silico* AND FUNCTIONAL OF THE SUGARCANE GENE "LIPID TRANSFER PROTEIN" (*LTP*) IN *Nicotiana tabacum* TRANSFORMANTS

ABSTRACT – The great expansion of sugarcane cultivation across Brazilian territory leads to the need to develop better cultivars and adapted to the different climatic conditions that are submitted. The biotic and abiotic stresses are factors that affect the productivity of a crop and among them, the water stress will assume great importance due to the rainfall regime and the increase of the imminent temperature in the next years. Analyzing the expression of genes in stress - stressed plants can contribute in an expressive way to elucidate as plant defense routes, contribute to the improvement of the culture and the development of new varieties. The objective of this project was to obtain transformers of *Nicotiana tabacum in vitro* with the *LTP* (*Lipid Transfer Protein*) gene and to evaluate its functionality in relation to stress due to water deficiency in a greenhouse by hydroponics. We made EST selection based on previous results obtained by a research group, later analysis in databases, performing a clone acquisition in the Gene Storage Center (BCCCenter) and re-sequencing to prove its identity. Silicon studies were carried out through the application of bioinformatics software and an analysis of the genetic function was performed from the genetic transformation of *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*. Six *N. tabacum* transformants with the *LTP* insert of interest were obtained and tested for tolerance to water deficit by induction of different concentrations of mannitol. Transformer tobacco plants showed better phenotypic performance compared to untransformed plant and good readaptation after stress. The T1 generation these plants will be used in studies for the biological and functional verification of the action of the inserted gene, through the Real-Time qPCR technique.

Keywords: *Agrobacterium*, cloning, water deficit.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores de etanol e açúcar do mundo, sendo a agroindústria sucroalcooleira um dos principais segmentos econômicos a colaborar com a economia brasileira desde o início do século XXI.

O dinamismo do setor sucroalcooleiro implica na crescente busca por novas áreas para o plantio de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Uma questão de vital importância na expansão territorial e o aumento da produtividade da cultura num país de dimensões continentais como o Brasil é o desenvolvimento de cultivares adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas. O problema energético pelo qual passa o país e a escassez cada vez maior dos recursos hídricos ditam a necessidade de desenvolvimento de variedades mais tolerantes.

O déficit hídrico é uma situação comum à produção de muitas culturas, podendo apresentar um impacto negativo substancial no crescimento e desenvolvimento das plantas. Essa deficiência provoca alterações no comportamento vegetal cuja irreversibilidade vai depender do genótipo, da duração, da severidade e do estágio de desenvolvimento da planta.

Uma das muitas atuações da pesquisa está em direcioná-la para um entendimento mais completo das respostas das plantas ao déficit hídrico; para isto, necessita-se de um conhecimento do crescimento e desenvolvimento das plantas, para que esses elementos possam contribuir para uma solução comum no entendimento da resposta das plantas ao déficit hídrico. Dentre as possibilidades, estudos que visam compreender as respostas fisiológicas e moleculares das plantas, têm ganhado destaque.

A transformação genética de plantas como *arabidopsis* ou tabaco é um caminho viável para o estudo da expressão diferencial de um gene de interesse. Utilizando-se de uma variedade de métodos que fornecem informações acerca de um determinado gene é possível elucidar a funcionalidade e os meios que levam à expressão diferencial deste. Esses métodos compreendem análises *in silico* para determinação inicial da relação do gene com o estresse em questão, conhecendo as funções da proteína ou mecanismos de ação; análises de parâmetros fisiológicos que favorecem o conhecimento do comportamento da planta em determinada situação e estudos a nível de expressão gênica.

6. CONCLUSÕES

- i) O gene *LTP* e seu produto gênico foram caracterizados por softwares e indicam que a proteína atua no meio extracelular, potencialmente promovendo o acúmulo de lipídios cuticulares. Dessa maneira, contribuindo para a tolerância da planta ao estresse por deficiência hídrica;
- ii) Seis transformantes de tabaco foram obtidos. Na avaliação de desempenho destes, observa-se que os transformantes apresentam características de tolerância ao estresse leve e severo, demonstrando capacidade de recuperação após o déficit hídrico. Esse desempenho pode estar relacionado ao fato de possuírem o gene *LTP*, que está favorecendo a capacidade dessas plantas de tolerar o estresse;
- iii) Análise de expressão diferencial do gene da geração T₁ dessas plantas, em experimentos de déficit hídrico, devem ser realizados para comprovação funcional do gene *LTP*;
- iv) Os transformantes 5.3 e 1.8 são as plantas recomendadas para os próximos estudos de tolerância ao estresse por seca.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDO, A.; SUMIDA, Y.; NEGORO, H.; SUROTO, D. A.; OGAWA, J.; SAKURADANI, E.; SHIMIZU, S. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4 and its application for eicosapentaenoic acid producer breeding. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, n. 17, p.5529-5535, 2009.
- ARAMEMNON, a Novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. **Plant Physiol**. v. 131, n. 1, p. 16-26, 2003.
- ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; FAGLIARI, J. R.; SANTOS, J. L. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. **Revista Brasileira de sementes**. vol. 29, n. 1, p.98-106, 2007.
- BARRETO, G. P.; LIRA, M. de A.; SANTOS, M. V. F.; DUBEUX JUNIOR, J. C. B. Avaliação de clones de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e de um híbrido com o milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) submetidos a estresse hídrico. **Revista Brasileira Zootecnia**. v.30, n. 1, p7-11, 2001.
- BEGCY, K.; MARIANO, E. D.; GENTILE, A.; LEMBKE, C. G.; ZINGARETTI, S. M.; SOUZA, G. M.; MENOSSI, M. A novel stress-induced sugarcane gene confers tolerance to drought, salt and oxidative stress in transgenic tobacco plants. **Plos One**. v. 7, n. 9, e44697, 2012.
- BERKOWITZ, G.A. Water and salt stress. In: RAGHAVENDRA, A.S. (Ed.). **Photosynthesis: comprehensive treatise**. Cambridge: Cambridge University, p.226-237, 1998.
- BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; BRAGA, J. F.; SÁ, M. E. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 21, n. 2, p. 95-102, 1999.
- BRASILEIRO, A. C. M.; ARAGÃO, F. J. L. O sistema *Agrobacterium*: do solo para o laboratório. In **Cultivo in vitro de plantas** (Ed. Cid, L. P. B.), p. 275-303, 2010. Brasília: Embrapa informação tecnológica.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO V. T. C. eds. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998.
- BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**. v. 103, p.1035-1040, 1993.
- BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**. v.2, p.48-54, 1997.
- BRAY, E. A. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. **Annual of Botany**. v. 89, p. 803-811, 2002.
- BUDZINSKI, I. G. F.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Caracterização *in silico* de genes de expansina presentes em cafeeiro. **Embrapa café (Anais e Proceedings de eventos)**, 5p, 2007.

- BUENO, M. R. P. **O Projeto Genoma Humano**. Bioética, v. 5. n. 2, 2009.
- CAMERON, K. D.; TEECE, M. A.; SMAERT, L. B. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. **Plant Physiol.** v. 140, p. 176-183, 2006.
- CAVALCANTE, A. C. R.; CAVALLINI, M. C.; LIMA, N.R.C.B. Estresse por déficit hídrico em plantas forrageiras. **Documentos/Embrapa Caprinos**, Sobral-CE, 2009. 50p
- CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany.** v. 55, n. 407, p.2365–2384, 2004.
- CHEN, H. J.; SU, C. T.; LIN, C. H.; HUANG, G. J.; LIN, Y. H. Expression of sweet potato cysteine protease SPCP2 altered developmental characteristics and stress responses in transgenic Arabidopsis plants. **Journal of Plant Physiology.** v.167, p.838–847, 2010.
- CHENG, Y.; WENG, J.; JOSHI, C. P.; NGUYEN, H. T. Dehydration stress-induced changes in translatable RNAs in sorghum. **Crop Sc.** v. 33, p. 1397-1400, 1993.
- CHENG, H. C.; CHENG, P. T.; PENG, P.; LYU, P. C.; SUN, Y. J. Lipid binding in rice nonspecific lipid transfer protein-1 complexes from *Oryza sativa*. **Protein Science.** v.13, n.9, p.2304-2315, 2004.
- Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2016. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, v. 3 – Safra 2016/2017, n. 3. Brasília, p.1-78. Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_27_16_30_01_boletim_cana_portugues_-3o_lev_-_16-17.pdf>. Acesso em 10 de jan. 2017.
- CREELMAN, R. A.; MASON, H. S.; BENSEN, R. J.; BOYER, J. S.; MULLET, J. E. Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. **Plant Physio.** v. 92, p.205-214. 1990.
- CUSTÓDIO, C. C.; SALOMÃO, G. R.; MACHADO NETO, N. B. Estresse hídrico na germinação e vigor de sementes de feijão submetidas a diferentes soluções osmóticas. **Revista Ciência Agronômica.** v. 40, n. 4, p. 617-623, 2009.
- DEBONO, A.; YEATS, T. H.; ROSE, J. K.; BIRD, D.; JETTER, R.; KUNST, L.; SAMUELS, L. Arabidopsis LTPG is a glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein required for export of lipids to the plant surface. **Plant Cell.** v. 21, p. 1230-1238, 2009.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin.** v.19, p.11-15, 1987.
- EMBL-EBI. The European Bioinformatics Institute Web Services. Disponível em [<http://www.ebi.ac.uk/>]. Acesso em 15 de abr. 2016.
- FERREIRA, P. V. **Estatística experimental aplicada à agronomia**. Maceió, EDUFAL, 1991. 437p.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium** (Lavras). v. 6, p. 36-41, 2008.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciênc. agrotec. [online]**. v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

- FINDELSTEIN, R. R.; GAMPALA, S. S. L.; ROCK, C.D. Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. **Plant Cell**. v. 14, p. 15-45, 2002.
- GAO, C.; LIU, J.; NIELSEN, K. K. 2009. Agrobacterium-mediated transformation of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds). **Plant Cell Reports**. 28(9):1431-1437, 2009.
- GASCHO, G. J.; SHIH, S. F. Sugarcane. In: Teare, I. D.; Peet, M. M. (Ed.). **Crop-Water relations**. New York: John Wiley, p. 445-479, 1983.
- GIBBON, B. C.; LARKINS, B. A. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. **Trends in Genetics**. v.21, n.4, p.227-233, 2005.
- 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 variedade de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande. v. 14, n. 4, p. 378-386, 2010.
- HAN, G. W.; LEE, J. Y.; SONG, H. K.; CHANG, C.; MIN, K.; MOON, J.; SHIN, D. H.; KOPKA, M. L.; SAWAYA, M. R.; YUAN, H. S.; KIM, T. D.; CHOE, J.; LIM, D.; MOON, H. J.; SUH, S. W. Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. **J Mol Biol**. v. 308, p. 263-278, 2001.
- HENSEL, G.; KASTINGER, C.; OLESZCZUK, S.; RIECHEN, J.; KUMLEHN, J. Agrobacterium-mediated gene transfer to cereal crop plants: Current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. **International Journal of Plant Genomics**. v. 209, p. 1-12, 2009.
- HINCHA, D. K.; NEUKAMM, B.; SROR, H. A.; SIEG, F.; WECKWARTH, W.; RECKELS, M.; LULLIEN-PELLERIN, V.; SCHRODER, W.; SCHMITT, J. M. Cabbage cryoprotectin is a member of the nonspecific plant lipid transfer protein gene family. **Plant Physiol**. v. 125, p. 835-846, 2001.
- HOH, F.; PONS, J. L.; GAUTIER, M. F.; DE LAMOTTE, F.; DUMAS, C. Structure of a liganded type 2 non-specific lipid-transfer protein from wheat and the molecular basis of lipid binding. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**. v. 61, p. 397-406. 2005.
- HOPKINS, W. G. **Introduction to plant physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1995. 464 p.
- HSIAO, T. C.; XU, L. K. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. **Journal of Experimental Botany**. v. 51, n. 350, p. 1595-1616, 2000.
- IDT. **Integrated DNA Technologies**. Disponível em [https://www.idtdna.com/calc/analyzer]. Acesso em 12 de jan. 2016.
- INMAN-BAMBER, N.G. Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. **Field Crops Research**. v.89, p.107-122, 2004.
- INMAN-BAMBER, N.G.; BONNETT, G.D.; SMITH, D.M.; THORBURN, P.J. Sugarcane physiology: integrating from cell to crop to advance sugarcane production. **Field Crops Research**. v.92, p.115-117, 2005.
- INMAN-BAMBER, N.G.; SMITH, D.M. Water relations in sugarcane and response to water deficit. **Field Crops Research**. v.92, p.185-202, 2005.
- INMAN-BAMBER, N.G.; BONNETT, G.D.; SPILLMAN, M.F.; HEWITT, M.L.; JACKSON, J. Increasing sucrose accumulation in sugarcane by manipulating leaf

extension and photosynthesis with irrigation. **Australian Journal of Agricultural Research**. v. 59, p. 13-26, 2008.

JIN H.; MARTIN C., Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. **Plant Molecular Biology**. v. 41, p. 577–585, 1999.

JOVINO, D. F. R. Expressão Gênica Diferencial Em Palmitos De cana-de-açúcar submetida a diferentes períodos de estresse hídrico, **Dissertação**, UNESP/FCAV, Jaboticabal, 2007.

JUNG, H. W.; KIM, W.; HWANG, B. K. Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. **Plant Cell Environ**. v. 26, p. 915-928, 2003.

KADER, J. C. Lipid-Transfer Proteins in Plants. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**. v.47, p.627-654, 1996.

KADER, J. C. Lipid-transfer proteins: a puzzling Family of plant proteins. **Trends in Plant Science**, v.2, n.2, p. 66-70, 1997.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**. v.17, p.287-291, 1999.

KERN, M. F.; MARASCHIN, S. D.; ENDT, D. D.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; PASQUALIL, G. Expression of a chitinase gene from *Metarhizium anisopliae* in tobacco plants confers resistance against *Rhizoctonia solani*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.160, n. 7, p.1933-46, 2009.

KILIAN, J.; WHITEHEAD, D.; HORAK, J.; WANKE, D.; WEINL, S.; BATISTIC, O.; D'ANGELO, C.; BORNBERG-BAUER, E.; KUDLA, J.; HARTER, K. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. **The Plant Journal**. v. 50, n. 2, p. 347-363, 2007.

KOVTUN, Y.; CHIU, WAN-LING; TENA, G.; SHEEN, J. Functional analysis of oxidative stress activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. **PNAS**. v.97, n.6, p.2940– 2945, 2000.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS, T. L. **Plant Physiological Ecology**. New York, Springer-Verlag. 540p, 1998.

LASCOMBE, M. B.; BAKAN, B.; BUHOT, N.; MARION, D.; BLEIN, J. P.; LARUE, V.; LAMB, C.; PRANGE, T. The structure of "defective in induced resistance" protein of *Arabidopsis thaliana*, DIR1, reveals a new type of lipid transfer protein. **Protein Sci**. v. 17, p. 1522-1530, 2008.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant Cell Environ**. v. 25, p. 275–294, 2002.

LEÃO, D. A. S. Estresse hídrico e adubação fosfatada no desenvolvimento inicial e na qualidade da forragem da gliricídia (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud.) e do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.). Patos – 2006. 60p. (**Dissertação de Mestrado em Zootecnia**), 2006.

LEE, S. B.; GO, Y. S.; BAE, H. J.; PARK, J. H.; CHO, S. H.; CHO, H. J.; LEE, D. S.; PARK, O. K.; HWANG, I.; SUH, M. C. Disruption of glycosylphosphatidylinositol-

- anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. **Plant Physiol.** v. 150, p. 42-54, 2009.
- LEITE, M. L.; FILHO, J. S. V.; RODRIGUES, J. D. Variação de prolina em folhas de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) submetido a diferentes déficits hídricos. **Revista Biotemas.** v.12, n.1 p.21-33. 2000.
- LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.;SHINOZAKI, K. Two transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought-and Low-Temperature Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis. **The Plant Cell.** v.10, p.1391–1406, 1998.
- LOGEMANN, E.; BIRKENBIHL, P. R.; ÜLKER, B.; SOMSSICH, I. E. An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the Arabidopsis transformation protocol, **Plant Methods.** v. 2, 2006.
- MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C.; COSTA, P. R.; DONÁ, F. L. Deficiência hídrica induzida por diferentes agentes osmóticos na germinação e vigor de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes.** v. 28, n. 1, p. 142-148, 2006.
- MALDONADO, A. M.; DOERNER, P.; DIXON, R. A.; LAMB, C. J.; CAMERON, R. K. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. **Nature.** v. 419, p. 399-403, 2002.
- MALECK, K.; LEVINE, A.; EULGEM, T.; MORGAN, A.; SCHMID, J.; LAWTON, K.A.; DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance, **Nat. Gen.** v. 26, p. 403–410, 2000.
- MANDEL, M.; HIGA, A. Calcium-dependent Bacteriophage DNA infection. **J. Mol. Biol.** v. 53, p. 159-162, 1970.
- MAYBANK, J.; BONSAI, B. R.; JONES, J.; LAWFORD, R. G.; O'BRIEN, E. G. Drought as a natural disaster. **Atmosphere-Ocean.** v. 33, p.195–222, 1995.
- MEDEIROS, N. M. C. Análise filogenética e funcional de dois genes de reparo homólogos a AP endonuclease em cana-de-açúcar: *ScARP1* e *ScARP3*. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.
- MOLINARI, H. B. C.; MARURA, C. J.; DAROS, E.; CAMPOS, M. K. F.; CARVALHO, J. F. R. P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; 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.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum.** v.15, p.473-497, 1962.
- NANJO, T.; KOBAYASHI, M.; YOSHIBA, Y.; SANADA, Y.; WADA, K.; TSUKAYA, H.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal.** v.18 (2), p.185–193, 1999.

- NIEUWLAND, J.; FERON, R.; HUISMAN, B. A.; FASOLINO, A.; HILBERS, C. W.; DERKSEN, J.; MARIANI, C. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. **Plant Cell**. v. 17, p. 2009-2019, 2005.
- NOGUEIRA, F. T. S.; SCHLO, P. S.; CAMARGO, S. R.; FERNANDEZ, J. H.; DE ROSA JR, V. E.; POMPERMAYER, P.; ARRUDA, P. SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. **Plant Science**. v.169, p. 93-106, 2005.
- PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M. **Fisiologia e Produção Vegetal**. Lavras. Ed. UFLA, 2006. 104 p.
- PEREZ, S. C. J. G. A. Crescimento e resistência à seca da algarobeira (*Prosopis juliflora* D.C.) cultivada em um solo de cerrado, com ou sem adubo orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 30, n. 5, p. 595-604, 1995.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. São Paulo: Nobel, 1985. 467p.
- PROVART, N. J.; GIL, P.; CHEN, W.; HAN, B.; CHANG, H. S.; WANG, X.; ZHU, T. Gene expression phenotypes of *Arabidopsis* associated with sensitivity to low temperatures. **Plant Physiology**. v. 132, p. 893-906, 2003.
- QING, Z. M.; JING, L. G.; KAI, C. R. Photosynthesis characteristics in eleven cultivars of sugarcane and their responses to water stress during the elongation stage. **Proc. ISSCT**. 24, p. 642-643, 2001.
- RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C.; OLIVEIRA, E. A. G.; SOUZA, J. A. M.; PINTO, M. S. T.; HANSEN, E. E. T. Transformação de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) com os genes recombinantes 35SHBsAg e 35SHBsAgER do vírus da hepatite B. **Biotemas**. v. 23, n. 1, p. 1-11, 2010.
- RIPOLI, T. C.C.; RIPOLI, M. L. C.; CASAGRANDE, D. V. I.; YOSHIRO, B. Plantio de cana-de-açúcar: estado da arte. Piracicaba: T.C.C. Ripoli, 2006, 216 p.
- ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I. E. A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence-and defense-related processes. **Plant Journal**. v. 28, p. 123-133, 2001.
- ROBERTSON, M.J.; MUCHOW, R.C.; DONALDSON, R.A.; INMAN-BAMBER, N.G.; WOOD, A.W. Estimating the risk associated with drying-off strategies for irrigated sugarcane before harvest. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.50, p.65-77, 1999.
- RODRIGUES, F. A.; LAIA, M. L.; ZINGARETTI, S. M. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. **Plant Science**. v. 176, p. 286-302, 2009.
- RODRIGUES, F. A.; LAIA, M. L.; NHANI JÚNIOR, A.; GALBIATI, J. A.; FERRO, M. I .T.; FERRO, J. A.; ZINGARETTI, S. M. Sugarcane Genes Induced by Water Stress. **Biologia Plantarum (Praha)**. v. 55, n.1, p. 43-53, 2011.
- SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; QIN, F.; OSAKABE, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHISHINOZAKI, K. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. **PNAS**. v.13, n.49, p.18822-18827, 2006.

- SALAH, H.B.H.; TARDIEU, F. Control of leaf expansion rate of droughted maize plants under fluctuating evaporative demand. **Plant Physiology**. v. 114, n. 3, p. 893-900, 1997.
- 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.
- SAROWAR, S.; KIM, Y. J.; KIM, K. D.; HWANG, B. K.; OK, S. H.; SHIN, J. S. Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco. **Plant Cell Rep.** v. 28, p. 419-427, 2009.
- SEIXAS, A. A.; GOMES, V. M.; SERAFIM, V. F.; VIANA, W. A. **Déficit hídrico em plantas forrageiras. Revisão de Literatura. UNIMONTES** – disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/z5kIk4Bzocde5Eb_2015-1-31-11-34-17.pdf>. Acesso em 25 de jan. 2017.
- SHAO, H. B.; GUO, Q. J.; CHU, L. Y.; ZHAO, X. N.; SU, Z. L.; HU, Y. C.; CHENG, J. F. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress Colloids and Surfaces B. **Biointerfaces**. v. 54, p. 37–45, 2007.
- SHI, H.; LEE, B. H. A.; WU, S. J.; ZHU, J. K. Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology**. v.21, p. 81-85, 2003.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought and cold stress. **Curr Opin Biotechnol**. v. 7, p. 161-167, 1996.
- SILVA, A.L.C. da; COSTA, W.A.J.M. de. Varietal variation in growth, physiology and yield of sugarcane under two contrasting water regimes. **Tropical Agricultural Research**. v.16, p.1-12, 2004.
- SILVA, M. A.; JIFON, J.; SILVA, J. A. G.; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Journal of Plant Physiology**. v. 19, n. 3, p.193-201, 2007.
- SILVA, T. G. F.; MOURA, M. S. B.; ZOLNIER, S.; SOARES, J. M.; VIEIRA, V. J. S.; JÚNIOR, W. G. F. Requerimento hídrico e coeficiente de cultura da cana-de-açúcar irrigada no semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande. v. 16, n. 1, p. 64-71, 2012.
- SILVA, M. A.; SILVA J. A.; G. ENCISO, J.; SHARMA, V.; JIFON, J. Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. **Sci. Agric**. v. 6, n. 6, p.620-627, 2004.
- SINGH, F. B.; FOLEY, R. C.; ONÑATE-SÁNCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 5, n. 5, p. 430-436, 2002.
- SIRICHANDRA, C.; WASILEWSKA, A.; VLAD, F.; VALON, C.; LEUNG, J. The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. **Journal of Experimental Botany**. v. 60, p. 1439–63, 2009.
- SMIT, M.A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**. v. 98, p. 91-97, 2006.

- SOARES, A. P. G. Caracterização *in silico* de genes envolvidos na biossíntese de oligossacarídeos de rafinose em soja e construção de cassetes de silenciamento do gene da estaquiase sintase, via interferência por RNA. Viçosa: UFV, 137 (**Doutorado em Bioquímica Agrícola**), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- SOLARI, L. I.; JOHNSON, S.; DEJONG, T. M. Relationship of water status to vegetative growth and leaf gas exchange of peach (*Prunus persica*) trees on different rootstocks. **Tree Physiol.** 26, p.1333–1341, 2006.
- SOUSA, C. S. Caracterização *in silico* de genes da biossíntese de lipídeos e utilização de eixos embrionários e nós-cotiledonares na transformação genética de soja. Viçosa: UFV, 94 (**Doutorado em Bioquímica Agrícola**), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.
- STERK, P.; BOOIJ, H.; SCHELLEKENS, G. A.; VAN KAMMEN, A.; DE VRIES, S. C. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. **Plant Cell.** v. 3, p. 907-921, 1991.
- SUGIHARTO, B. Biochemical And Molecular Studies On Sucrose-Phosphate Synthase And Drought Inducible-Protein In Sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Journal ILMU DASAR.** v. 5, n. 1, p. 62-67, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology.** 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 792p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.
- TÁVORA, F.J.A.F.; MELO, F.I.O. Respostas de cultivares de amendoim a ciclos de deficiência hídrica: crescimento vegetativo, reprodutivo e relações hídricas. **Ciência Agrônômica.** v.22, n.1/2, p. 47-60, 1991.
- TAYLOR, C. B. Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. **Plant Cell,** Rockville, v. 8, p. 1221-1224, 1996.
- TEJERA, N. A.; RODÉS, R.; ORTEGA, E.; CAMPOS, R.; LLUCH, C. Comparative analysis of physiological characteristics and yield components in sugarcane cultivars. **Field Crops Research.** v.102, p.64–72, 2007.
- TORMENA, C. A.; SILVA, A. P.; GONÇALVES, A. C. A.; FOLEGATTI, M. V. Intervalo ótimo de potencial da água no solo: um conceito para avaliação da qualidade física do solo e manejo da água na agricultura irrigada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** v. 3, n. 3, p. 286-292, 1999.
- TOPFER, R.; MATZEIT, V.; GRONENBORN, B.; SCHELL, J.; STEINBISS, H. H. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. **Nucleic Acids Research.** v. 15, n. 14, 1987.
- TORRES, A. C. et al. Bioassay for detection of transgenic soybean seeds tolerant to glyphosate. **Pesquisa agropecuária brasileira.** v. 38, p. 1053-1057, 2003.
- USDA – United States Department of Agriculture, 2013. **USDA Agricultural Projections to 2022.** Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/media/1013562/oce131.pdf>>. Acesso em 15 de out. 2014.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids.** v. 35, p. 753-759, 2008.

- 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, n. 4, p. 523–539, 2006.
- WAN, X.; TAN, J.; LU, S.; LIN, C.; HU, Y.; GUO, Z. Increased tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco expressing a wheat oxalate oxidase gene via induction of antioxidant enzymes is mediated by H₂O₂. **Journal of Plant Physiology**. v. 136, n. 1, p. 30–44, 2009.
- WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**. v.218, p.1–14, 2003.
- WEI, K.; ZHONG, X. Non-specific lipid transfer proteins in maize. **BMC Plant Biology**. v. 14, 2014.
- WIEDENFELD, B. Scheduling water application on drip irrigated sugarcane. **Agricultural Water Management**. v. 64, p. 169–181, 2004.
- WINTER, D.; VINEGAR, B.; NAHAK, H.; AMMAR, R.; WILSON, G. V.; PROVART, N. J. An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. **Plos one**. v. 2, n. 8, 2007.
- YEATS, H.; ROSE, J. K. C. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). **Protein Sci**. v. 17, n. 2, p. 191–198, 2008.
- ZHANG, G.; CHEN, M.; LI, L.; XU, Z.; CHEN, X.; GUO, J.; MA, Y. Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. **Journal of Experimental Botany**. v. 60, p. 2–16, 2009.
- ZHENG , Z.; XU, X.; CROSLEY , R. A.; GREENWALT, S. A.; SUN, Y.; BLAKESLEE, B.; WANG , L.; NI, W.; SOPKO, M. S.; YAO, C.; YAU, K.; BURTON, S.; ZHUANG, M.; MCCASKILL, D. G.; GACHOTTE, D.; THOMPSON, M.; GREENE, T. W. The Protein Kinase SnRK2.6 Mediates the Regulation of Sucrose Metabolism and Plant Growth in Arabidopsis. **Plant Physiol**. v.153, p.99 - 113, 2010.
- ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**. v. 53, p.247–273, 2002.
- ZUURBIER, P.; VOOREN, J. V. Sugarcane ethanol Contributions to climate change mitigation and the environment. In: **Introduction to sugarcane ethanol contributions to climate change mitigation and the environment**. Wageningen, Netherlands, cap.1, p. 19–26, 2008.