

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

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM PALMITOS DE**  
**CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDA A DIFERENTES PERÍODOS**  
**DE ESTRESSE HÍDRICO**

**Daniele Fernanda Revoredo Jovino**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro**

**Coorientadora: Profa. Dra. Sônia Marli Zingaretti**

**Coorientador: Dr. Roberto Willians Noda**

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

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**  
Julho de 2007

J86e Jovino, Daniele Fernanada Revoredo  
**Expressão Gênica Diferencial em Palmitos de Cana-de-  
açúcar Submetida a Diferentes Períodos de Estresse  
Hídrico/** Daniele Fernanda Revoredo Jovino. -- Jaboticabal,  
2007

xiii, 81 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro

Banca examinadora: João Suzuki, Poliana Fernanda

Giachetto

Bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Estresse Hídrico. 3. Vias Metabólicas.  
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 633.61:631.52

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

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**DANIELE FERNANDA REVOREDO JOVINO** – nascida em 15 de agosto de 1981, no município de Jundiaí - SP, filha de José Osnei Jovino e Vera Lúcia Revoredo Jovino. Bióloga, graduada em Bacharelado e Licenciatura pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, em dezembro de 2003. Em março de 2005 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticabal).

## *CRESCER É...*

*Ser cada dia um pouco mais nós mesmos. ...*  
*Dar espontaneamente sem cobrar inconscientemente. ...*  
*Aprender a ser feliz de dentro para fora. ...*  
*Buscar no próximo um meio de nos prolongarmos. ...*  
*Sentir a vida na natureza. ...*  
*Entender a morte como natural da vida. ...*  
*Conseguir a calma na hora do caos. ...*  
*Ter sempre uma arma para lutar e uma razão para ir em frente. ...*  
*Saber a hora exata de parar e buscar um algo novo. ...*  
*Não devanear sobre o passado, mas trabalhar em cima dele para o futuro...*  
*Reconhecer nossos erros e valorizar nossas virtudes. ...*  
*Conseguir a liberdade com equilíbrio para não sermos libertinos. ...*  
*Exigir dos outros, apenas o que nós damos a eles. ...*  
*Realizar sempre algo edificante. ...*  
*Ser responsável por nossos atos e por suas conseqüências. ...*  
*Entender que temos o espaço de uma vida inteira para crescer. ...*  
*Nos amarmos para que possamos amar os outros como nós mesmos..*  
*Assumir que nunca seremos grandes,*  
*mas que o importante é estar sempre em crescimento.*

*Autor desconhecido*

*À Deus por me proporcionar força e coragem em todos os momentos da minha vida., segurando em minhas mãos com seu infinito amor.*

*Aos meus pais José Osnei e Vera Lúcia,  
pelo amor, apoio, incentivo, força, ensinamento, diálogo,  
exemplo de vida e por estarem sempre presentes. AMO VCS.*

*Aos meus irmãos Rodrigo Cesar e Carla Cristina  
pelo amor e companheirismo de cada dia.*

*Ao meu grande Amore Nelson, pelo amor,  
Carinho, paciência, por fazer parte da minha vida e por estar  
sempre por perto me apoiando e me incentivando.*

***TE AMO!!!!!!!!!!!!***

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro** por acreditar em mim, pela orientação e confiança, incentivo e amizade que me possibilitou crescimento profissional e pessoal graças às oportunidades concedidas sempre com confiança, apoio, conselhos e amizade.

Ao **Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro** pela oportunidade de crescimento, pelos ensinamentos, amizade e acima de tudo pela confiança.

À **Profa. Dra. Sônia Marli Zingaretti** pelos ensinamentos e pelas confecções das membranas de marcoarranjos.

Ao **Dr. Roberto Willians Noda** pelos ensinamentos, amizade e a oportunidade de dar continuidade em seus experimentos.

A **Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton**, pelas orientações na condução do experimento com as plantas de cana-de-açúcar.

À UNESP/Jaboticabal, ao ex-coordenador **Prof. Dr. Rinaldo Cesar de Paula** e ao atual coordenador **Prof. Dr. Dilermando Perecin** e demais professores do Programa de Pós-Graduação (Genética e Melhoramento de Plantas) pela importante contribuição no aperfeiçoamento de minha formação acadêmica.

Aos Profs. componentes da banca de qualificação: **Dra. Poliana Fernanda Giachetto** e **Prof. Dr. João Suzuki**, pelas correções e sugestões aplicadas no exame de qualificação.

Aos Profs. componentes da comissão examinadora **Dra. Poliana Giachetto** e **Prof. Dr. João Suzuki**, novamente pela disponibilidade em participar da banca visando o aperfeiçoamento deste trabalho e de minha formação.

À minha grande amiga **Karina Maia Dabbas (Ká)**, que além de realizar o ensaio experimental e a coleta do material vegetal, disponibilizando-o para realização de meu trabalho de mestrado me proporcionou momentos de muitas alegrias e ensinamentos. Te adoro, Ká.

Aos meus dois “anjos” **Regina Amélia de Sousa (Rê)** e **Maria Angela Coelho (Angel)** pela preciosa amizade, ensinamentos e conquistas. Adoro vocês.

A minha grande amiga **Maria Luiza (Lú)** pela amizade conquistada no lab. Amiga, te adoro.

Ao meu primo **Julinho**, pelos momentos de aprendizado e carinho vividos no laboratório e na faculdade.

A minha querida tia **Roseli**, pela oportunidade e carinho vividos no lab.

A todos que passaram pelo LBM e deixaram saudades: **Thiago Gréggio, Thaísa, Haroldo, Roberto, Rô Borges, Ju Rossi, Eli, Tatiana (Tatona), Tatiane, Malu, Vanessa Morgan (Van), Vanessa Parpi., Prof. Julio, Cedral, Leticia, Ju Deza, Ju Vantini, Paula, Rafael Homem, Rafael Heck, Joice, Lilian, Leonardo (Biela), André (Splinter) e Roberto.**

As amigas do LBM: **Flavia e bebê, Gisele, Fabiana, Mariza, Agda, Ju De Antônio, Thaís, Flavinha e Elaine.**

Aos amigos do LBM: **Gustavo, Rafael Marine, Cristiano, Tiago e Jordano.**

Ao **Dr. Marcelo Luiz de Laia** pela realização das análises estatísticas, indispensáveis para a interpretação dos dados obtidos pela técnica de macroarranjos.

Ao **Nilson e Mariana** pela realização da categorização das ESTs, apresentada no presente trabalho.

Aos bioinformatas: **Renata e Fabrício** pela amizade, atenção e compreensão durante todo este período.

A **todos os funcionários do Departamento de Tecnologia** pela amizade.

Ao auxílio financeiro da **CAPES** pela bolsa de mestrado.

**A todos os meus sinceros agradecimentos.**

*“Primeiro surge um pensamento. Quando esse pensamento é forte, ocorre uma ação. Se essa ação é praticada com disciplina, transforma-se em hábito. E nossos hábitos nos conduzem a um destino.”*

*(Sivananda)*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>X</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>XI</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVO</b> .....	<b>3</b>
<b>III. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
3.1 CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	4
3.2 ESTRESSES ABIÓTICOS QUE COMPROMETEM A CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR .....	5
3.3 RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO.....	6
3.4 METODOLOGIA DOS MACROARRANJOS DE DNA .....	11
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
4.1 MATERIAL VEGETAL, CONDIÇÕES DE ESTRESSE E COLETA DOS TECIDOS.....	13
4.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL .....	15
4.3 LEVANTAMENTO DAS PRINCIPAIS ENZIMAS DE INTERESSE PERTENCENTES AS VIAS METABÓLICAS DE PLANTAS .....	16
4.4. PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS PARA MACROARRANJO .....	16
4.5 HIBRIDAÇÕES .....	17
4.5.1 Síntese da sonda de cDNA.....	17
4.5.2 Pré-hibridação e Hibridação das Membranas de Alta Densidade .....	18
4.5.3 Lavagem das membranas .....	19
4.6 REMOÇÃO DA SONDA .....	19
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	19
4.8 ANÁLISE POR FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA.....	21
<b>V. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>22</b>
5.1 MATERIAL VEGETAL, CONDIÇÕES DE ESTRESSE E COLETA DOS TECIDOS.....	22
5.2 INTEGRIDADE DO RNA TOTAL .....	22
5.3 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	23
5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	25
5.4.1 Separação dos genes: Induzidos e Reprimidos .....	26
5.5 ANÁLISE POR FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA.....	27
5.5.1 Categorização dos Dados.....	27
5.6 EXPRESSÃO DOS GENES NA CATEGORIA DE BIOENERGÉTICA: VIA DO METABOLISMO DE AÇÚCAR E AMIDO .....	29
5.6.1 Invertase de parede celular .....	33
5.6.2 Síntese da Sacarose .....	34
5.6.3 Biossíntese de Trealose .....	37
5.6.4 Hexoquinase .....	39



5.7 EXPRESSÃO DOS GENES NA CATEGORIA DO METABOLISMO SECUNDÁRIO: METABOLISMO DA GLICINA BETAÍNA.....	41
5.8 EXPRESSÃO DOS GENES DA CATEGORIA DO METABOLISMO DE AMINOÁCIDO: METABOLISMO DA PROLINA.....	45
5.9 EXPRESSÃO DOS GENES NA CATEGORIA DE RESPOSTA AO ESTRESSE: BIOSÍNTESE DO JASMONATO .....	50
<b>VI. CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>

## **EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM PALMITOS DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDA A DIFERENTES PERÍODOS DE ESTRESSE HÍDRICO**

**RESUMO** - Sob condições de estresse hídrico, a cana-de-açúcar pode sofrer mudanças fisiológicas e bioquímicas, tais como diminuição nas atividades fotoquímicas, redução da fixação de CO<sub>2</sub> e acúmulo de osmólitos e osmoprotetores. O objetivo deste trabalho foi identificar, através da técnica de macroarranjo de cDNA, o perfil de expressão de genes promotores das diferentes vias metabólicas em palmitos da variedade de cana-de-açúcar SP80-3280 submetidas ao estresse hídrico nos dias 5, 9, 13 e 17 após o início da condição de supressão de água, sendo considerado o dia 1 como controle. Os resultados do macroarranjo mostraram que as proteínas mais expressas sob déficit hídrico pertencem a quatro categorias das quais as ESTs mais importantes foram selecionadas. As quatro categorias descritas abaixo estão discutidas neste trabalho. As ESTs da via do metabolismo de açúcar e amido (invertase de parede celular (INV), sacarose fosfato sintase (SFS), sacarose fosfato fosfatase (SFF), trealose fosfato sintase (TFS), trealose fosfato sintase/fosfatase (TFS/F) e hexoquinase (HXQ)) pertencem a categoria de bioenergética. Colina monooxigenase (CMO) e betaína aldeído desidrogenase (BADH) as quais pertencem a via do metabolismo de glicina betaína, foram selecionadas a partir da categoria do metabolismo secundário. A terceira categoria compreende as ESTs do metabolismo de aminoácido (D-pirrolina-5-carboxilato sintase (P5CS), ornithina δ-aminotransferase (OAT) e prolil 4-hidroxilase (PH)) as quais pertencem a via da biossíntese de prolina, e a quarta categoria, resposta ao estresse, compreende as ESTs aleno oxido sintase (AOS), aleno oxido ciclase (AOC) e lipoxigenase (LOX), pertencentes a via de biossíntese do jasmonato.

**Palavras-chave:** etiqueta de seqüência expressa (EST), macroarranjo de cDNA, *Saccharum spp*

## **DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN SUGARCANE LEAFROLL TISSUES UNDER DIFFERENT PERIODS OF WATER RESTRICTION**

**SUMMARY** - Under water deficit, sugarcane undergoes physiological and biochemical alterations such as photochemical activity reduction, CO<sub>2</sub> fixation reduction and the accumulation of osmolytes and osmoprotectants. This work was undertaken to identify the gene expression profile in sugarcane (var. SP80-3280) under water deficit through the cDNA macroarray technique. Leafroll tissues were collected from plants subjected to 5, 9, 13 and 17 days of water restriction, and day 1 was used as control. Macroarray results showed that most proteins expressed under water restriction belong to four categories, from which the most important ESTs were selected. The four categories described below are discussed in this work. Sugar and starch metabolism pathway ESTs (cell wall invertase (CWI), sucrose phosphate synthase (SPS), sucrose phosphate phosphatase (SPP), trehalose phosphate synthase (TPS), trehalose phosphate synthase phosphatase (TSP/P) and hexoquinase (HXQ) were selected from the bioenergetics category. Choline monooxygenase (CMO) and betaine aldehyde dehydrogenase (BADH), which belong to the glycine betaine metabolism pathway, were selected from the secondary metabolism category. The third category comprised the amino acid metabolism ESTs  $\Delta$ -pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS), Ornithine  $\delta$ -aminotransferase (OAT) and Prolyl 4-hydroxylase (PH), which belong to the proline biosynthesis pathway, and the fourth category, stress response, comprised the ESTs for Allene oxide synthase (AOS), Allene oxide cyclase (AOC) and Lipoxygenase (LOX), which belong to the jasmonate biosynthesis pathway.

**Key words:** cDNA membrane, expressed sequence tag (EST), *Saccharum spp*

## I. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar é de grande importância nas regiões tropicais e subtropicais, sendo de especial significado econômico para alguns países da América Central e do Sul, principalmente para o Brasil, que é o maior produtor mundial (SACIOTO, 2003) com uma safra de 386.584.387 milhões de toneladas em 2005/2006 (UNICA, 2007).

Em ambientes naturais e agricultáveis, as plantas freqüentemente crescem sob condições desfavoráveis, tais como a seca, a salinidade, o resfriamento, o congelamento, a alta temperatura, alagamento ou intensa luminosidade, dentre outros. Estas condições são coletivamente chamadas de estresses abióticos e qualquer uma delas pode retardar o crescimento e o desenvolvimento, reduzir a produtividade e, em casos extremos, levar a planta à morte (QUIANG *et al.*, 2000).

O estresse hídrico resulta da deficiência hídrica ou do excesso de água no ambiente, sendo o primeiro mais comum. Não há um processo vital que não seja afetado de alguma forma pelo declínio do potencial hídrico (TAYLOR, 1996; LARCHER, 2004). O estresse por déficit hídrico, diminui o potencial hídrico do solo, interferindo diretamente na eficiência do uso da água pelas plantas, as quais necessitam então desenvolver um potencial hídrico mais negativo que o do solo, de modo a manter um gradiente de potencial hídrico entre o solo e a planta (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Nas células vegetais, em resposta ao estresse, ocorrem mudanças na expressão gênica. A resposta é iniciada quando a planta reconhece o estresse em nível celular. A partir do reconhecimento do estresse, vias de transdução de sinal são ativadas, as quais, por sua vez, transmitem a informação dentro de células individuais e da planta inteira (BRAY *et al.*, 2000).

A transdução de sinal requer uma adequada coordenação espacial e temporal de todas as moléculas de sinalização. Dessa forma, há moléculas que participam na modificação, entrega ou reunião dos componentes da sinalização, mas diretamente não estabelecem o sinal. Estas proteínas incluem proteínas modificadoras (por exemplo,

enzimas para formação de lipoproteínas, metilação, glicosilação e ubiquitinação de proteínas), proteínas que formam armações e proteínas adaptadoras (XIONG & ZHU, 2001).

Aliando-se a disponibilidade das bibliotecas de cDNA com a robótica de alta precisão na deposição de pequenas amostras em superfícies sólidas, tornou-se possível a preparação dos “arrays” (arranjos) de clones de cDNA em membranas de náilon ou em lâminas de vidro (PASSOS *et al.*, 1999), propiciando uma nova abordagem nos estudos da regulação gênica, viabilizando o monitoramento dos níveis de transcritos de um grande número de genes simultaneamente (FELIX *et al.*, 2002).

Neste trabalho, analisou-se o perfil da expressão gênica pelo emprego da técnica de macroarranjo de cDNA sincronizada com a evolução da progressiva restrição da água disponível a nível celular de enzimas relacionadas às vias metabólicas de açúcar e amido, síntese da glicina betaína, síntese da prolina e biossíntese do jasmonato em tecidos jovens que formam o palmito da planta. A escolha desta região meristemática apical baseia-se principalmente na dependência quase que exclusiva dos açúcares translocados a partir das folhas adultas. Isto torna o palmito diretamente dependente e influenciado pela eficácia da fotossíntese além de representar a fonte pós embrionária de todos os órgãos da parte aérea da planta, sendo supostamente provida dos mais avançados recursos genéticos de proteção e adaptação das plantas as adversidades ambientais.

## **II. OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo analisar, através da técnica de macroarranjo de cDNA, o perfil da expressão das principais ESTs relacionadas as categorias de bioenergética, metabolismo secundário, metabolismo de aminoácido e resposta ao estresse em palmitos da variedade de cana-de-açúcar SP80-3280 submetida a diferentes períodos de estresse hídrico.

### III. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Cultura de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, uma monocotiledônea alógama e semi-perene, pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*. É originária do Sudeste Asiático, na grande região central da Nova Guiné e Indonésia, sendo que a maioria das variedades comerciais é originária do cruzamento inter-específico de *Saccharum officinarum* com outras espécies do gênero, tais como *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barbieri* e *S. edule*. Desde os tempos do Brasil colônia até os dias atuais, a cultura da cana-de-açúcar tem sido uma grande fonte de riqueza para a economia brasileira (SACIOTO, 2003).

A atividade canavieira do Brasil é responsável por cerca de um milhão de empregos diretos, 511 mil apenas na produção de cana-de-açúcar. O restante está distribuído na agroindústria de açúcar e álcool. O Estado de São Paulo reúne cerca de 400 mil empregos diretos do setor, ocupando aproximadamente 5,4 milhões de hectares no país, o que representa menos de 1% da área nacional. O agronegócio brasileiro é responsável por 20,6 % do Produto Interno Bruto - PIB brasileiro e gera 14 % dos empregos totais do país (UNICA, 2007).

O sucesso do cultivo da cana-de-açúcar se deve à utilização de variedades, obtidas por meio de melhoramento genético clássico, desenvolvido pelos centros de pesquisa e estações experimentais. Este é um processo relativamente demorado, visto que, dentre as espécies cultivadas, a cana-de-açúcar possui um dos genomas mais complexos, o que dificulta a aplicação de técnicas convencionais de melhoramento nesta planta (VETTORE *et al.*, 2001).

Devido à grande importância da cana-de-açúcar na economia mundial, a FAPESP, através da rede ONSA (Organização para Seqüenciamento e Análise de Nucleotídeos), financiou o programa Sugar Cane EST Genome Project (SUCEST <http://sucest.lad.dcc.unicamp.br>) de seqüenciamento de genes expressos da cultura,

representado por 240.000 ESTs gerados a partir de 26 bibliotecas de cDNA construídas a partir de diferentes órgãos, como raiz, colmo, folhas, flores e sementes, obtidos em vários estágios de desenvolvimento e submetidos a variações ambientais diversas incluindo interações com bactérias (VETTORE *et al.*, 2001). As ESTs foram agrupadas dentro de 43.141 “contigs” distintos, usando o programa CAP3 (HUANG & MADAN, 1999). Desta forma, o seqüenciamento do transcriptoma da cana-de-açúcar facilitou e acelerou a identificação de genes responsáveis por qualidades desejáveis, tornando possível a manipulação subsequente de genes de interesse através de técnicas de genética molecular (SACILOTO, 2003). A elucidação dos mecanismos de defesa da planta frente ao estresse hídrico possibilitará o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar mais resistentes e de grande interesse econômico.

### **3.2 Estresses abióticos que comprometem a cultura da cana-de-açúcar**

O estresse é considerado como um desvio significativo das condições ótimas para a vida, e induz a mudança e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes. Mesmo se uma condição de estresse é somente temporária, a vitalidade da planta torna-se cada vez menor conforme a duração do mesmo (LARCHER, 2004).

As plantas estão expostas a vários tipos de estresses ambientais que afetam de maneira negativa seu crescimento, metabolismo e produtividade. A seca, salinidade, baixas e altas temperaturas, inundação, poluentes e radiação são os fatores de estresse mais importantes que limitam a produtividade das culturas (LAWLOR, 2002).

O estresse hídrico é um fator dos mais importantes quando se pensa em aumentar a produtividade dessa cultura; as plantas podem ser afetadas se o ambiente contiver excesso ou se a quantidade ou qualidade de água disponível é insuficiente para suprir as necessidades básicas da planta (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A água é uma das substâncias essenciais à vida de um vegetal, pois está intrinsecamente relacionada com várias funções como estrutura, crescimento,



transporte e metabolismo. É a substância mais abundante em plantas em crescimento ativo, podendo constituir cerca de 90% do peso fresco de muitos órgãos; embora em sementes e em tecidos muito lignificados possa ter valores inferiores a 15% ou menos. A água é também o constituinte principal do protoplasma; forma um meio contínuo através da planta e seu volume atua como absorvente de calor e permite, em parte, a tamponização da temperatura interna; permite o desenvolvimento da pressão de turgescência que dá um elevado grau de rigidez ao conteúdo celular e à parede celular envolvente e, além de tudo isso, a entrada e saída de água de certos tecidos ou células é responsável por uma série de micro movimentos nas plantas (MENESES *et al.*, 2006).

No Brasil, dentre estes fatores, o estresse hídrico é o que mais influencia de forma negativa a produtividade da cana-de-açúcar. Assim, seus efeitos nas plantas incluem tamanho das células foliares, potencial de água na planta e redução nas taxas de assimilação de CO<sub>2</sub>, crescimento, transpiração e abertura estomática (HSIAO, 1973; TAIZ & ZEIGER, 2004). Desta maneira, o déficit hídrico influencia de maneira direta o crescimento dos perfilhos e a altura final dos colmos e, conseqüentemente, a produção de açúcar (GASCHO & SHIH, 1983; SUGIHARTO, 2004).

### **3.3 Resposta ao déficit hídrico**

Embora sejam conhecidos os danos decorrentes da seca no crescimento das plantas, os efeitos primários do déficit hídrico em níveis bioquímicos e moleculares ainda não são bem entendidos (ZHU, 2002; CHAVES *et al.*, 2003).

O decréscimo de umidade no solo reduz o potencial de água na folha e sua condutância estomática, promovendo o fechamento dos estômatos (YORDANOV *et al.*, 2003), bloqueando o influxo de CO<sub>2</sub> para as folhas, diminuindo o acúmulo de fotoassimilados, o que implica na redução da produtividade. Portanto, a deficiência hídrica é uma das maiores causas de perdas econômicas nesta cultura (SANTOS & CARLESSO, 1998; PIMENTEL & HEBERT, 1999; OBER & LUTERBACHER, 2002).

O fechamento estomático é considerado a primeira linha de defesa contra dessecação (CHAVES & OLIVEIRA, 2004), ocorrendo mesmo antes de haver diminuição do conteúdo de água da folha (YORDANOV *et al.*, 2000). Contudo, o principal objetivo do fechamento estomático é evitar a cavitação e uma falha do sistema de condução de água (ao invés de objetivar apenas a reposição das perdas de água pela transpiração), visto que os estômatos podem responder diretamente ao aumento da tensão de água no xilema, fechando-se (KRAMER & BOYER, 1995).

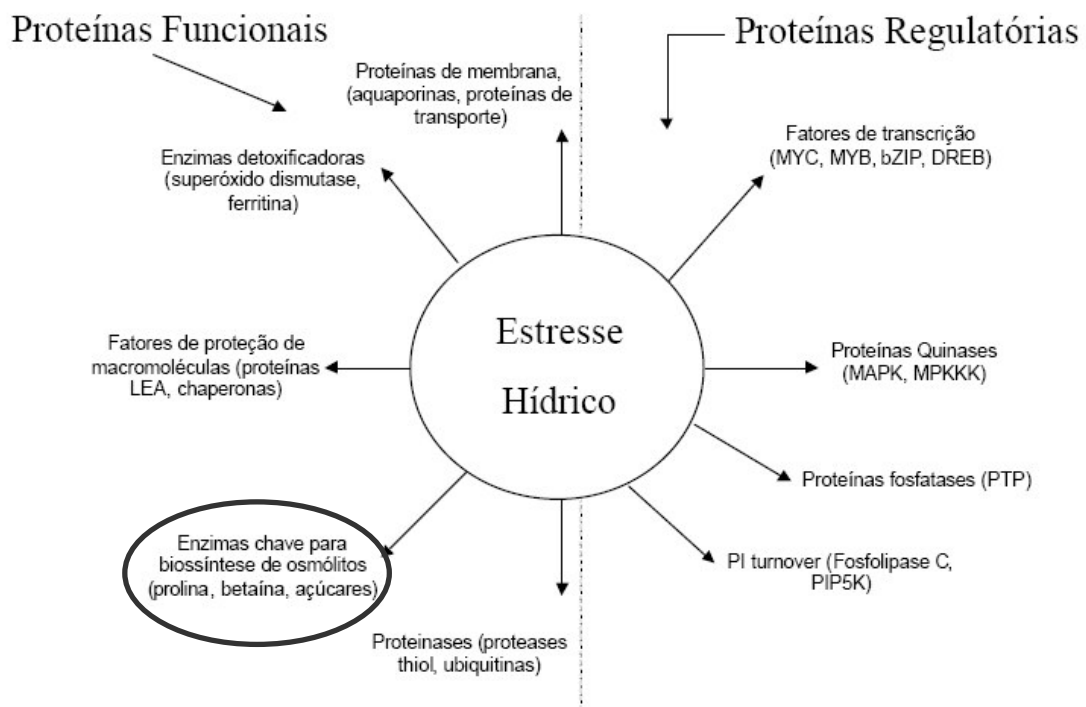
Em termos moleculares, o sinal de estresse, uma vez produzido pela célula vegetal, deve ativar uma rota de transdução que envia esta mensagem aos fatores de transcrição, que regulam a expressão dos genes encarregados da resposta ao estresse. A perda do volume e da turgescência celular ou a concentração de solutos altera a conformação de proteínas da parede celular e da membrana plasmática da célula vegetal, ativando rotas de transdução de sinais que dão lugar à expressão de determinados genes, transformando assim o fenômeno físico do déficit hídrico em uma resposta bioquímica (WILLADINO & CAMARA, 2005).

A expressão dos genes durante o estresse hídrico não garante que um produto gênico promova a habilidade da planta em sobreviver. De modo que a expressão gênica resulta de ferimento ou dano que tenha ocorrido durante o estresse, enquanto outros podem ser induzidos mas não alteram a tolerância. Apesar disso, alguns genes são necessários para a tolerância ao estresse e o acúmulo dos produtos desses genes é uma resposta adaptativa (BRAY, 1993).

Os produtos de genes induzidos pelo estresse podem ser classificados em três grandes grupos (**Figura 1**): 1- aqueles que protegem a planta contra os estresses ambientais; 2- aqueles que regulam a expressão gênica e a transdução de sinais de resposta a estresses e 3- os de funções desconhecidas (SEKI *et al.*, 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2005).

O primeiro grupo inclui proteínas que funcionam protegendo as células da desidratação, como as enzimas envolvidas na biossíntese de vários osmoprotetores, tais como prolina e betaínas, proteínas LEA (“late embryogenesis abundant”), chaperonas e enzimas detoxificadoras. Os níveis de moléculas osmoprotetoras

geralmente aumentam durante o estresse. Vários genes codificando enzimas envolvidas na biossíntese dessas moléculas já foram isolados, como colina desidrogenase e colina oxidase (síntese de glicina betaína), manitol-1-fosfato desidrogenase (síntese de manitol); trehalose-6-fosfato desidrogenase (síntese de trehalose); e D1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (síntese de prolina). Genes codificando enzimas que sintetizam moléculas osmoprotetoras podem ser utilizados na obtenção de plantas transgênicas com maior tolerância a estresses abióticos (HARE & CRESS, 1997, HARE *et al.*, 1998; SERRAJ & SINCLAIR, 2002; MOLINARI *et al.*, 2004).



**FIGURA 1:** Genes induzidos durante o estresse hídrico e suas possíveis funções na resposta e tolerância ao estresse (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Todos os efeitos da indução dos genes recaem primariamente sobre as regiões meristemáticas, cujas células iniciam um processo de ajuste em todas as vias metabólicas dos açúcares, envolvendo essencialmente o dissacarídeo trealose e a regulação nas atividades da enzima hexoquinase (FRANCIS & HALFORD, 2006). Um componente como a trealose, um dissacarídeo não redutor de glicose, inicia uma importante função fisiológica em um estresse abiótico, protegendo um grande número de organismos, incluindo bactéria, levedura e invertebrados (CROWE, 1992).

Apesar de que o metabolismo de açúcares em plantas submetidas ao estresse hídrico ainda permaneça como uma questão em aberto, existem alguns fatos que têm sido confirmados, quais sejam os danos sofridos pelos cloroplastos devido ao estresse oxidativo imposto pela desarmonia entre a quantidade de energia luminosa absorvida e a produção líquida de açúcares pela fotossíntese (MUNNÉ-BOSCH *et al.*, 2001; KRIEGER-LISZKAY, 2004), que se encontra limitada pela baixa disponibilidade de CO<sub>2</sub> foliar, devido a sua menor condutância nos tecidos foliares (WARREN & DREYER, 2006), como também devido ao maior fechamento dos estômatos em resposta ao déficit hídrico (LAWLOR, 2002).

Uma outra estratégia empregada pelas plantas para sobreviver aos estresses abióticos, tais como a salinidade, temperaturas extremas, alta intensidade luminosa e a seca inclui o sistema de osmorregulação que abrange: carboidratos, aminoácidos e compostos de amônia quaternária, que desempenham um papel importante no ajuste osmótico e na estabilização de células vegetais (CHA-UM *et al.*, 2006).

As betaínas são compostos de amônio quaternário em que o átomo do nitrogênio é metilado totalmente. As betaínas mais comuns nas plantas incluem a glicina betaína, prolina betaína,  $\beta$ -alanina betaína, colina-O-sulfato e 3-dimetilsulfo-niopropionato (RHODES & HANSON, 1993; MCNEIL *et al.*, 1999). A glicina betaína é requerida para proteger a planta, mantendo o contrapeso da água entre a célula vegetal e o ambiente, estabilizando as macromoléculas (CHEN & MURATA, 2002; RONTEIN *et al.*, 2002).

Sob o estresse, a síntese de proteína é inibida e a degradação de proteínas é acelerada, o que leva a um acúmulo de aminoácidos e aminas livres (LARCHER, 2000). As plantas, quando expostas a diversos tipos de estresse ambiental, notadamente o

hídrico, podem apresentar acúmulo de prolina, putrescina e poliaminas. O acúmulo destes compostos sob déficit hídrico tem sido associado com a tolerância das plantas a essa condição desfavorável, podendo representar um mecanismo regulador da perda de água, mediante aumento da osmolaridade celular (potencial hídrico) (FUMIS & PEDRAS, 2002).

L-prolina é um dos 20 aminoácidos presentes nas proteínas de todos os organismos vivos. Aminoácidos são moléculas que contêm ambas porções amino (-NH<sub>2</sub>) e um grupo funcional carboxil (-COOH). Diferentemente, prolina contém uma porção imino (C=NH), um grupo funcional carboxil e um grupo imino secundário, tendo sido reportada como um importante osmoprotetor em muitas plantas (MOLINARI, 2006). A prolina, por possuir um anel pirrolina, que confere uma baixa capacidade de ceder elétrons, forma um complexo de transferência de carga e sequestra O<sub>2</sub> livre. Assim, a prolina pode reduzir o dano por fotoinibição nas membranas do tilacóide pelo seqüestro e redução da produção de íons superóxido (REDDY *et al.*, 2004).

As plantas sintetizam compostos do metabolismo secundário, denominados fitohormônios, para adequar seu metabolismo às diversas condições ambientais e regular os processos fisiológicos necessários ao seu desenvolvimento. Alguns dos fitohormônios mais ativos em plantas, envolvidos em processos como a senescência, florescimento e defesa contra estresses, são os jasmonatos (Jas). Jasmonatos é um termo que define uma classe de compostos de derivados lipídicos cujos principais representantes são o ácido jasmônico (AJ) e o metil jasmonato (MeJA) (De ROSA, 2005). Fitohormônios são reconhecidos tanto funcionando em uma rede complexa de sinalização, frequentemente com efeitos interativos, sobre a expressão de resposta da planta para estresse como a seca, ventos, ou ataques de insetos e patógenos (ZHU, 2002; KUNKEL & BROOKS, 2002). O ácido jasmônico é um dos hormônios de fundamental importância na resposta a estresse, ferimentos e moléculas elicitoras (DOARES *et al.*, 1995; KRAMELL *et al.*, 1995; PARCHMANN *et al.*, 1997; LEON *et al.*, 2001). A via do ácido jasmônico envolve vários eventos de transdução de sinais, como por exemplo: a percepção do ácido jasmônico e indução de resposta de defesa e

finalmente a integração da sinalização do ácido jasmônico com as vias do ácido salicílico, etileno e outras vias de sinalização (TURNER *et al.*, 2002).

### 3.4 Metodologia dos macroarranjos de DNA

Com o advento da era genômica, a identificação de genes tornou-se um processo mais dinâmico, capaz de gerar um vasto volume de informação em um curto período de tempo (GRIVET *et al.*, 2001). Juntamente com os projetos ESTs, surgiram novas técnicas capazes de avaliar a expressão de milhares de genes simultaneamente. Dois exemplos desta técnica são o micro e macroarranjos de DNA. Estes arranjos de DNA podem ser gerados utilizando-se cDNAs inteiros, ESTs, produtos de PCR ou mesmo oligonucleotídeos (SCHENA *et al.*, 1995.; SCHENA *et al.*, 1998; DESPREZ *et al.*, 1998; SCHUMMER *et al.*, 1999; FREEMAN *et al.*, 2000).

Os macroarranjos de DNA são uma alternativa para os microarranjos. Sua principal vantagem é a não necessidade de equipamentos especiais para hibridação (FREEMAN *et al.*, 2000). A técnica também vem sendo empregada com sucesso nos estudos de expressão diferencial em diferentes tecidos e resposta a estresses (DESPREZ *et al.*, 1998; SCHUMMER *et al.*, 1999; CARSON *et al.*, 2002).

Os macroarranjos de DNA possibilitam a identificação de rotas metabólicas ativadas ou desativadas, assim como a visualização das centenas de interações que ocorrem, em âmbito transcricional, em resposta a eventos fisiológicos diversos. Com isso é possível delinear estratégias que visem aumentar a tolerância às condições de estresse ambiental (NEPOMUCENO *et al.*, 2001).

O estudo com macroarranjos de cDNA, contendo os inúmeros clones de genes de cana-de-açúcar, é um grande trunfo para o avanço científico e tecnológico da pesquisa nacional, permitindo a associação desses genes, quando diferencialmente expressos, a funções no crescimento e no desenvolvimento, nas respostas a diversos tipos de estresses, bem como nas mais variadas condições testadas. A partir dessas análises, esses genes poderão ser utilizados em cana-de-açúcar, através de

manipulações genéticas, para a geração de variedades com um maior número de características economicamente desejáveis (SOUZA & DA SILVA, 2002).

#### IV. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Campus de Jaboticabal.

##### 4.1 Material vegetal, condições de estresse e coleta dos tecidos

Os toletes da variedade de cana-de-açúcar SP80-3280 (considerada medianamente ao estresse hídrico) foram gentilmente cedidos pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) com 6,5 cm (centímetros) de comprimento médio e com massa média de 95 g (gramas), sendo plantados em vasos plásticos com capacidade de 3,5 L (litros). Os vasos, com massa média de 185 g, foram preenchidos até que o conjunto vaso + tolete + solo atingisse massa de 3.800 g (um volume médio de solo de 2,8 L), com solo latossolo vermelho escuro, textura média.

Os toletes de cana-de-açúcar cresceram em casa de vegetação inicialmente sem controle de temperatura e umidade. A partir do 41º ao 48º dia de crescimento e durante a fase de estresse hídrico controlou-se a temperatura ( $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ), umidade relativa do ar (média de 70 %) e luminosidade natural (transmitida através do plástico da casa de vegetação).

O volume de água nos vasos foi mantido em, no máximo, 70 % dos poros do solo preenchidos com água, através de reposições diárias da massa de água diminuída pela evapotranspiração. Para se conhecer o volume de água correspondente, utilizou-se as seguintes equações e considerações:

$$ds = ms / Vs$$

$$ds = 3.520 / 2.800$$

$$ds = 1,2571 \text{ g} / \text{cm}^3$$



ds = densidade do solo seco ( $\text{g} / \text{cm}^3$ )

ms = massa do solo seco (g)

Vs = volume do solo seco ( $\text{cm}^3$ ).



$$\alpha = [1 - ds / dP] \times 100$$

$$\alpha = [1 - 1,2571 / 2,65] \times 100$$

$$\alpha = 52,56 \%$$



$\alpha$  = volume total de poros do solo (%)  
 $dP$  = densidade das partículas sólidas do solo (2,65 g / cm<sup>3</sup>).

$$Va = Vs \times \alpha \times X \%$$

$$Va = 2.800 \times 52,56 \% \times 70 \%$$

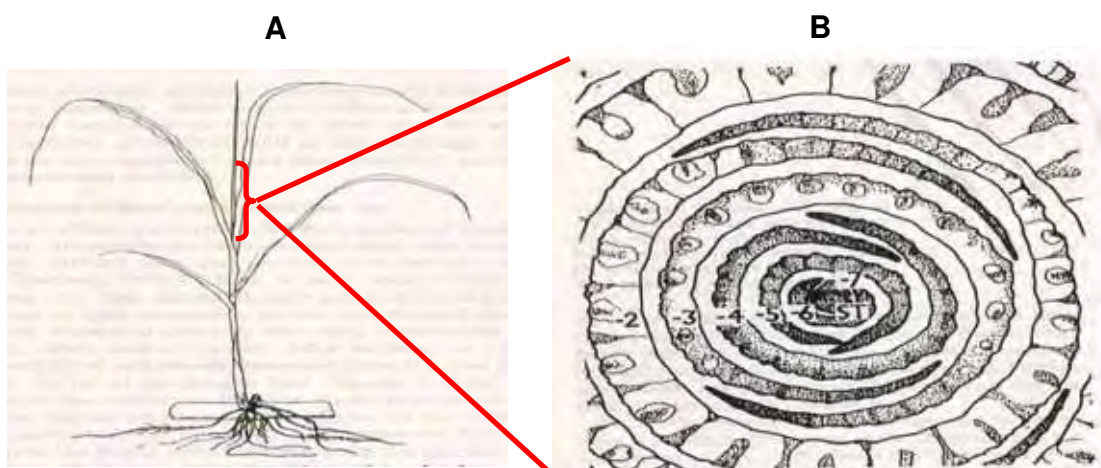
$$Va = 1.030 \text{ cm}^3$$



$Va$  = volume de água (cm<sup>3</sup>)  
 $X \%$  = porcentagem de poros do solo que devem conter água.

Considerando-se a densidade da água como sendo igual a 1 ( $d_a = 1 \text{ g / cm}^3$ ), deveríamos manter a massa do conjunto com água em um máximo de 4.830 g (= 95 + 185 + 3520 + 1030).

A primeira coleta foi feita no 49<sup>o</sup> dia (considerado o dia 1 sem reposição de água). A partir de então, a cada quatro dias foram feitas coletas das amostras de palmito (com tamanho médio de 8 cm) e aferições da massa das plantas submetidas ao estresse hídrico (5, 9, 13 e 17 dias). Na **figura 2** podemos observar a localização do palmito coletado nos dias de estresse.



**Figura 2.** (A) Esquema de uma plântula de cana-de-açúcar sinalizando o local da amostragem. (B) Corte transversal evidenciando a região central do palmito (Fonte: CLEMENTS, 1980).

As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para serem posteriormente armazenadas a -80 °C.

## 4.2 Extração de RNA total

O RNA total foi isolado de cada uma das amostras (1, 5, 9, 13 e 17 dias de estresse hídrico). As extrações de RNA foram realizadas de acordo com a metodologia e o reagente Trizol, da Invitrogen, transferindo 0,3 g de tecido a um gral e iniciando a pulverização utilizando o pistilo e nitrogênio líquido. A homogeneização do pó do tecido foi feita em 2 mL de Trizol. O homogeneizado foi transferido para um tubo de centrífuga de vidro (Corex) de 15 mL. As amostras foram incubadas por cinco minutos à temperatura ambiente (23°C). Foram adicionados 0,4 mL de clorofórmio para cada 1 mL do reagente Trizol e, então, as amostras foram agitadas vigorosamente em vortex e incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x *g* por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo Corex de 15mL e o RNA foi precipitado pela adição de 0,4 mL de álcool 2-propanol para cada 1 mL de reagente Trizol usado na homogeneização inicial. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos e depois centrifugada a 12.000 x *g* por igual período, a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 75% (1 mL de etanol para cada 1 mL de reagente Trizol utilizado na homogeneização inicial). As amostras foram agitadas vigorosamente em vortex e centrifugadas à 7.500 x *g* por 5 minutos. O precipitado de RNA foi dissolvido em 0,1 mL de água livre de RNase (água tratada com dietilpirocarboneto) e armazenado à 80°C.

A quantificação do RNA extraído foi feita em biofotômetro (Eppendorf), na diluição de 1:10 (v/v). As medidas de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda de 260 e 280nm, utilizando-se água/DEPC para o ajuste inicial do aparelho. A qualidade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) contendo 6,7% de formaldeído (v/v).

### **4.3 Levantamento das principais enzimas de interesse pertencentes as vias metabólicas de plantas**

A seleção das principais enzimas pertencentes as vias metabólicas de plantas foram pesquisadas em livros e sítios especializados na internet. Após a seleção destas enzimas, procurou-se na página do projeto SUCEST as ESTs relacionadas às mesmas. A escolha das ESTs mais representativas de cada enzima (aquelas que apresentavam seqüências contendo o maior número de bases correspondentes ao começo do gene) foram selecionadas para compor as membranas de macroarranjo. As ESTs escolhidas tiveram as seqüências de nucleotídeos comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados internacional GENBANK (NCBI) por meio do algoritmo BLAST-X. As ESTs foram consideradas representativas quando o valor do e-value foi menor ou igual a  $1 \times 10^{-10}$ .

### **4.4. Preparação de membranas para macroarranjo**

Para realização do ensaio foi utilizado um conjunto de cinco membranas de alta densidade confeccionadas a partir do DNA plasmidial de clones das ESTs selecionadas, oriundos de diferentes bibliotecas de cDNA do projeto SUCEST. Uma membrana foi utilizada para cada tratamento realizado em triplicata, respectivamente. As amostras de DNA plasmidial contendo as ESTs de cana-de-açúcar foram obtidas por meio de micro-preparação realizada através de lise alcalina em placas de 96 poços. Foram transferidas 1.202 amostras de DNA plasmidial para membranas de náilon de 85 x 125 mm, carregadas positivamente (Genetix), com o auxílio de um sistema automatizado (Q-BOT-GENETIX-UK) do Centro Brasileiro de Estocagem de Clones (<http://www.bcccenter.fcav.unesp.br/>). As amostras foram depositadas em duplicata com espaçamento de 900 microns entre pontos, num arranjo 3x3, perfazendo um total de 2.404 pontos por membrana. Para o monitoramento de hibridações não-específicas, o ponto central de cada arranjo não recebeu amostra, representando, assim, o controle

negativo. Após a transferência do DNA, as membranas foram submetidas a tratamento em solução de denaturação (NaCl 1,5M e NaOH 0,5M) e de neutralização (NaCl 1,5M e Tris Base 1M pH 7) por 5 e 10 min., respectivamente e, logo em seguida, o DNA foi imobilizado na membrana por meio de irradiação com luz UV (1600 joules/cm<sup>2</sup>), seguindo as recomendações do fabricante (Genetix,UK).

## 4.5 Híbridações

### 4.5.1 Síntese da sonda de cDNA

As sondas de cDNA foram sintetizadas seguindo o protocolo descrito por SCHUMMER *et al.* (1999) com algumas modificações.

Em um tubo de centrífuga estéril foram adicionados 30 µg de RNA total e 156 pmoles de Oligo dT18VN (Invitrogen), resultando em um volume final de 7,5 µL. A mistura foi mantida a 75 °C durante 10 minutos e, em seguida, transferida para o gelo. Foram adicionados à reação: 5,0 µL de tampão de síntese de primeira fita (5x, Invitrogen); 2,5 µL DTT (100mM); 2,0 µL RNAGuard; 2,5 µL de dNTPs (dATP, dGTP e dTTP a 10mM cada) e 3µL <sup>33</sup>P-αdCTP (30 µCi). Incubou-se a reação durante 5 minutos a 42 °C sendo, em seguida, adicionado 1,25 µL da enzima Superscript II (Invitrogen, 200U/µL). Após uma rápida centrifugação, a amostra foi mantida por 30 minutos a 42 °C. Após esse período, foi adicionado 1,25 µL de dCTP sem marcação radioativa (10mM) e a reação novamente incubada a 42°C durante 2 horas. Em seguida, adicionou-se 1,0 µL de Poly-A (2,0 µg/µL) e a reação foi desnaturada a 94 °C por 5 minutos. Após a desnaturação, foram adicionados 1,4 µL de NaOH 5 M e a reação mantida a 37 °C durante 15 minutos. A seguir foram adicionados 1,8 µL HCl 3,94 M e 7,0 µL Tris-HCl 1,0 M pH 7,5. Para a purificação da sonda, o volume da reação foi ajustado para 50 µL com água deionizada e estéril. A sonda foi purificada, para a retirada de nucleotídeos livres através de uma coluna Sephadex G-50 equilibrada com

STE (0,1 M NaCL, 10 mM Tris HCL (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)) a qual foi montada em uma seringa de 1,0 mL contendo lã de vidro siliconizada em sua extremidade inferior (SAMBROOK *et al.*, 1989). Através de centrifugação a 4.000 rpm (centrífuga clínica) durante 4 minutos, o volume eluído da coluna foi recuperado em um novo tubo estéril. Em seguida, 100 µL de STE foram adicionados à coluna e, após nova centrifugação a 4.000 rpm durante 4 minutos, o volume eluído foi coletado e adicionado ao obtido anteriormente. A incorporação radioativa nas fitas de cDNA (sonda) foi avaliada por meio de um cintilador líquido (Beckman LS6500, USA) e, após esta leitura, a sonda foi desnaturada a 95 °C durante 5 minutos e, em seguida, mantida no gelo até o momento de ser adicionada à solução de hibridação nos frascos contendo as membranas.

#### **4.5.2 Pré-hibridação e Hibridação das Membranas de Alta Densidade**

As membranas foram colocadas, inicialmente, em solução SDS 0,1% fervente, para redução do background. As pré-hibridações e hibridações foram realizadas como descrito em (<http://www.tree.caltech.edu/protocols/overgo.html>). As membranas foram colocadas em frascos cilíndricos (15 x 3,5 cm) contendo a solução de pré-hibridação (1,0 % (p/v) de BSA (Fraction V, Sigma); 7,0 % de SDS (99,9%); 0,5 M de tampão fosfato de sódio pH 7,0 e 1,0 mM de EDTA) e incubadas em forno de hibridação Hybaid (Halbrook, NY) a 58 °C, com rotação dos frascos por 4 horas, durante a primeira utilização das membranas. Utilizou-se um volume de 10 mL de solução de pré-hibridação por membrana. A solução de pré-hibridação foi mantida nos frascos durante o período de hibridação visto que, a solução de hibridação apresenta a mesma composição que a anterior. Após a purificação e desnaturação das sondas, durante 5 minutos a 95 °C (descrito no item 4.5.1), elas foram adicionadas nos frascos, contendo as membranas e a solução de pré-hibridação e, então, realizada a hibridação durante 18 horas a 58 °C. Após este período, as membranas foram lavadas.

### **4.5.3 Lavagem das membranas**

Após a hibridação, as membranas foram lavadas para retirada do excesso de sonda e das hibridações inespecíficas. Esse processo foi executado por 3 vezes, por períodos de 30 minutos cada, a 58 °C, de maneira sucessiva, com aproximadamente 100 mL das seguintes soluções: 2 x SSC + 0,1% SDS; 1,5 x SSC + 0,1 % SDS; 0,5 x SSC + 0,1 % SDS. Após a última lavagem as membranas foram removidas da solução e seladas para exposição em cassetes (Imagem Plate-Fujifilm) por um período de 96 horas. Em seguida, procedeu-se à digitalização da imagem através de um leitor de fósforo radioativo (Phosphoimager FLA3000-G -Fujifilm, Tokyo) o qual gerou imagens digitalizadas que foram armazenadas em mídia digital (Compact Disc) para posterior análise.

### **4.6 Remoção da sonda**

Cada membrana foi hibridada três vezes com sondas preparadas de maneira independente. Para a remoção da sonda as membranas foram lavadas 2 vezes, por períodos de 15 minutos a 65 °C, com 100 mL de solução (pré-aquecida a 65 °C) por membrana contendo 0,4 N NaOH + 0,1 % SDS e depois lavadas 2 vezes à temperatura ambiente com uma solução de 0,1 % SDS + 0,1 % SSC + 0,2 N Tris-HCl pH 8,0. As membranas foram novamente seladas e colocadas nos cassetes por períodos de 96 horas. A eficiência da remoção da sonda foi monitorada repetindo-se o processo de leitura do sinal obtido pelo fósforo radioativo.

### **4.7 Análise estatística dos dados**

As imagens geradas foram analisadas, usando-se o programa ArrayVision 8.0 (Image Research / Amersham Biosciences), o qual transforma a intensidade luminosa emitida por um ponto da membrana em valor numérico. Previamente, foi informado ao

programa um mapa indicando os locais da membrana onde existia sonda e onde não existia. Do mesmo modo, também foi informado o nome da sonda correspondente a um dado ponto da membrana. Logo, para cada imagem obtida de uma dada membrana, o programa gerou uma tabela contendo um número de linhas igual ao número de pontos/ESTs presentes na membrana, incluindo os pontos que só apresentam DMSO em sua composição (controle negativo). Essa tabela contém pelo menos três colunas: a primeira contém a identificação do ponto, LR, por exemplo, uma possui os valores referentes à emissão de fundo (“background”) e uma outra possui os valores referentes ao sinal emitido pelo interior do ponto/EST (“foreground”). Uma vez que foram realizadas três repetições para cada ponto de análise (1, 5, 9, 13 e 17 dias) ao final foram obtidas 15 imagens, que, após análise com o ArrayVision, geraram 15 tabelas distintas.

As tabelas geradas pelo programa ArrayVision 8.0, em formato texto delimitado por tabulações, foi lida no programa estatístico R em ambiente GNU Linux Debian 3.2. No ambiente estatístico R, a qualidade dos arranjos foi avaliada por meio da visualização gráfica, as intensidades foram normalizadas e as subseqüentes análises estatísticas realizadas. O pacote, para o programa R limma foi utilizado para averiguar a qualidade, para realizar as normalizações e para identificar os genes diferencialmente expressos. Antes do processo de normalização, os valores referentes à emissão de fundo foram subtraídos do respectivo valor colhido para o ponto onde se localizava a sonda, gerando o valor líquido para o respectivo ponto. Em seguida, geraram-se gráficos do tipo box plot para verificar a necessidade de se realizar uma normalização. Se verificada essa necessidade, esta foi feita globalmente, aplicando o método VSN (HUBER *et al.*, 2002), e sua eficácia foi averigüada produzindo e observando o mesmo tipo de gráfico observado antes da normalização. Após a normalização, realizaram-se os procedimentos estatísticos e os genes diferencialmente expressos em cada situação de interesse foram identificados, com uma significância de 5% ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ). A fim de controlar a seleção de falsos positivos, utilizou-se um valor de FDR igual a 0,05 para selecionar os genes significativos, ou seja, dentre todos os genes selecionados, a taxa de falsos positivos estará, estatisticamente, sempre abaixo de 5%.

#### **4.8 Análise por ferramentas de bioinformática**

As seqüências foram analisadas no Setor de Bioinformática do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da FCAV/UNESP e submetida aos bancos de dados de nucleotídeos para identificação da seqüência de EST utilizada. A análise buscou a identificação e localização das proteínas por eles codificadas nas vias metabólicas já citadas. Para isso, utilizaram-se inicialmente, ferramentas de identificação como Proteome Analyst 2.0, e, em seguida, bancos de dados públicos de motivos e domínios de proteínas (Prosite, Pfam, ProDom, Interpro, entre outros). Após a busca nos bancos de dados públicos, os clones foram agrupados nas categorias propostas pelo SUCEST, denominadas: metabolismo de aminoácido; bioenergética; comunicação celular/transdução de sinal; dinâmica celular; metabolismo de DNA; metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isoprenóides, elementos genéticos móveis; metabolismo de nitrogênio, enxofre e fosfato; metabolismo de nucleotídeos; crescimento e desenvolvimento de plantas; metabolismo de proteínas; metabolismo e transcrição de RNA; metabolismo secundário; proteínas de estocagem; resposta a estresse; transporte; proteína putativa e não classificada. O agrupamento se deu com base na função biológica exercida pela proteína.



## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Material vegetal, condições de estresse e coleta dos tecidos

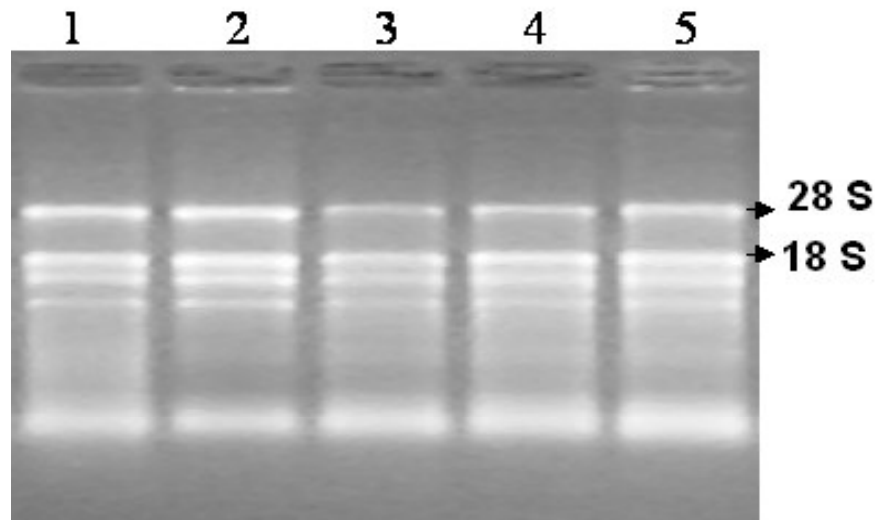
Os dados referentes aos dias de supressão da rega a partir do 49º dia estão apresentados na **Tabela 1**. Observou-se que as plantas controle apresentavam 66,2% da capacidade de campo. No 5º dia houve uma redução bastante acentuada na capacidade de campo, e no 9º dia provavelmente estas encontravam-se em ponto de murcha permanente e no 17º dia apresentaram morte aparente.

**Tabela 1.** Características das amostras obtidas.

Lote de palmitos coletados	Dias de supressão de rega a partir do plantio	% de poros do solo com água
1	49 = 48 + (1)	66,2
5	53 = 48 + (5)	20,7
9	57 = 48 + (9)	10,5
13	61 = 48 + (13)	0
17	65 = 48 + (17)	0

### 5.2 Integridade do RNA total

Os resultados obtidos na quantificação dos diferentes RNAs apresentaram densidade optica ( $A^{260}/A_{280}$ ) em torno de 1,8. A integridade do RNA total demonstrada através de eletroforeses em géis de formaldeído - agarose 1,5 % está apresentada na **Figura 3**.



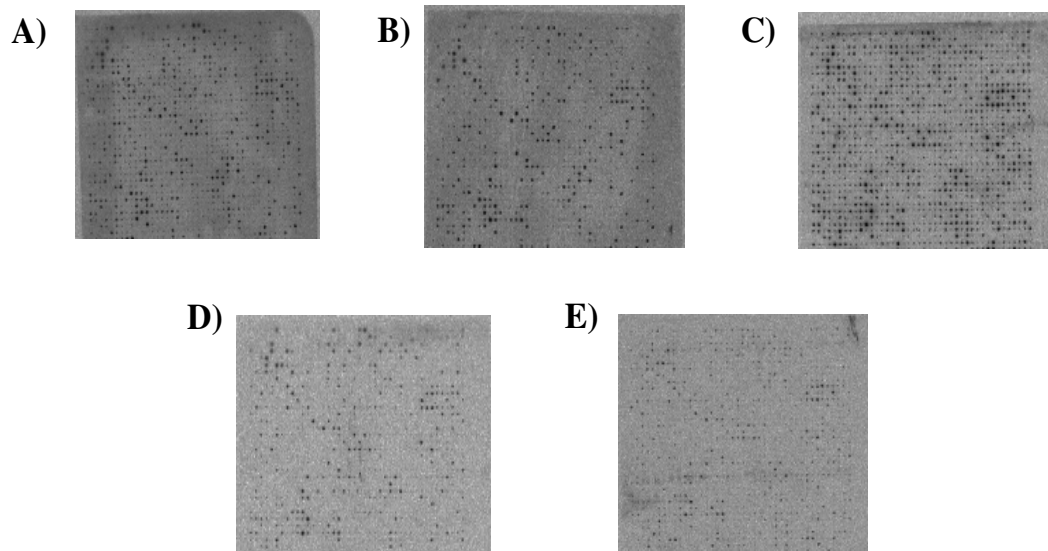
**Figura 3:** Eletroforese, em gel desnaturante de agarose 1,5 % a 88 volts por 1,5 hora. Foram aplicados 5  $\mu$ g de RNA total extraído de palmito de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280. (1) RNA total extraído de amostra submetida a 1 dia de supressão de rega, (2) 5 dias, (3) 9 dias, (4) 13 dias, (5) 17 dias de supressão de rega.

Conforme observado na **Figura 3**, a análise da qualidade do RNA total das amostras, baseado na presença de bandas dos rRNAs (RNAs ribossômicos) 28S e 18S demonstram a integridade do RNA total. A quantificação e a integridade do RNA total extraído são necessárias, uma vez que a eficiência do processo de hibridação é influenciada por diversos parâmetros experimentais, em especial, pela qualidade e quantidade de RNA utilizado na síntese da sonda de cDNA (FELIX *et al.*, 2002).

### 5.3 Perfil de Expressão Gênica

A técnica de macroarranjos de cDNA foi empregada com o objetivo de identificar o padrão de expressão gênica nas amostras do palmito de cana-de-açúcar da

variedade SP80-3280 submetida a estresse hídrico. O perfil de expressão gênica pode ser observado pelo contraste entre membranas do dia 1 (controle) com os demais intervalos de 5, 9, 13 e 17 dias de supressão da rega, para identificar ESTs diferencialmente expressas na cinética proposta (**Figura 4**).



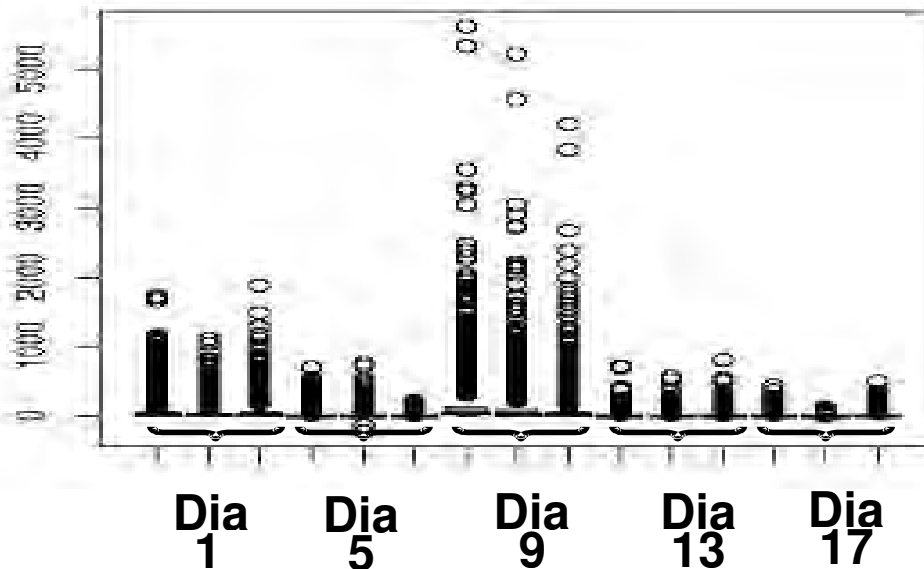
**Figura 4:** Imagens digitalizadas das membranas de macroarranjos (85x125 cm), contendo 1.202 clones em duplicata, hibridadas a partir de 30  $\mu$ g de RNA total de palmito de cana-de-açúcar, em diferentes intervalos de supressão de rega, marcados com  $^{33}\text{P}$ - $\alpha$ dCTP. (A) 1 dia, (B) 5 dias, (C) 9 dias, (D) 13 dias, (E) 17 dias de supressão de rega.

Na **Figura 4** observa-se as imagens digitalizadas das membranas de macroarranjos exemplificando o perfil de expressão em cada intervalo de coleta das amostras de cana-de-açúcar. Pode-se observar que a imagem das membranas hibridadas com sondas produzidas a partir de amostras de cana-de-açúcar submetidas ao nono dia (C) de supressão da rega apresentaram um perfil de expressão diferente quando comparado aos demais dias, sendo possível observar que houve um maior número de pontos hibridados neste dia e um menor número no décimo sétimo dia (E). Estes resultados estão correlacionados com a diferença observada na intensidade de

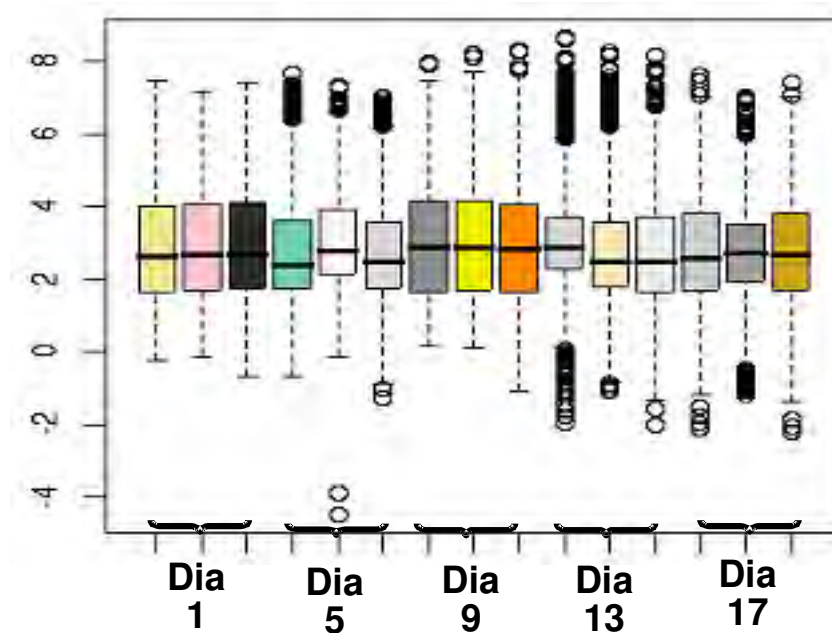
sinais obtidos para um determinado ponto (EST), após hibridação com cDNAs da planta em condição controle ou estressada, que refletem, em última instância, as quantidades de RNAs mensageiros produzidos em ambas condições.

#### 5.4. Análise estatística dos dados

Após a hibridação das membranas, os sinais radioativos emitidos pelos clones ESTs foram quantificados através do programa ArrayVision 8.0 (Imaging Research, Canada) e os dados numéricos obtidos foram transformados em logaritmo na base 2, de forma a torná-los dados paramétricos. A fim de possibilitar a comparação entre diferentes experimentos de macroarranjos, a estabilização das variâncias e uma normalização foram aplicadas aos dados através do pacote VSN. Com este pacote, o controle de qualidade foi investigado por meio de gráficos estatísticos apropriados, sendo eles: diagrama de caixas (boxplots), antes da normalização (**Figura 5**) e diagrama de caixas (boxplots) pós normalização (**Figura 6**).



**Figura 5.** Diagrama de caixas (boxplots) de todos os dados da variedade de cana-de-açúcar SP80-3280 antes de serem normalizados.



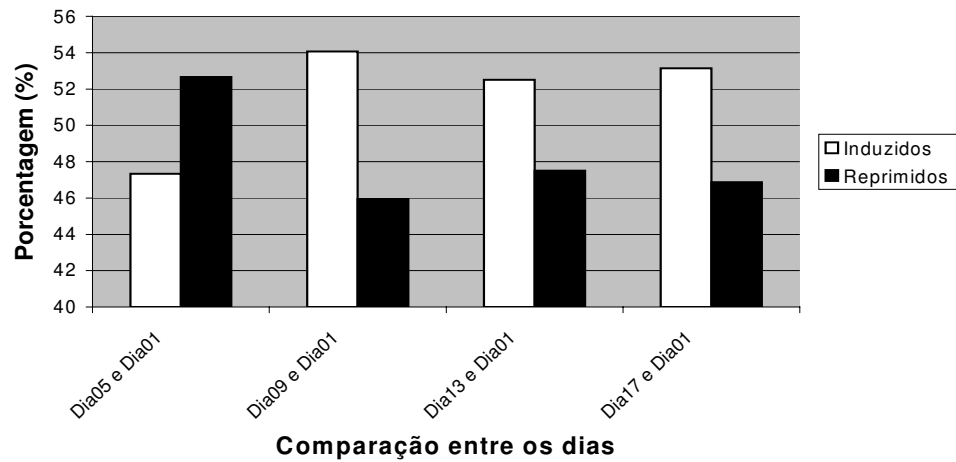
**Figura 6.** Diagrama de caixas (boxplot) de todos os dados da variedade de cana-de-açúcar SP80-3280 após a normalização.

Na **Figura 6**, observou-se que após a normalização dos dados, estes apresentaram-se dentro de uma distribuição normal, sendo então aplicadas as análises estatísticas para a interpretação dos resultados. Após a realização desta análise, um gene (EST) foi considerado diferencialmente expresso, quando seu p-value foi menor que 5% e o B estatístico maior do que zero.

#### 5.4.1 Separação dos genes: Induzidos e Reprimidos

Após a normalização dos dados, as ESTs foram separadas em dois grupos, induzidos e reprimidos, para cada dia de estresse. Observou-se que a quantidade de

genes induzidos foi menor no dia 5 e maior no dia 9 e para os demais dias, não diferindo muito do dia 9 (**Figura 7**).



**Figura 7:** Gráfico da porcentagem de clones induzidos e reprimidos nos dias 5, 9, 13 e 17 de indução ao estresse hídrico em comparação com o dia 1.

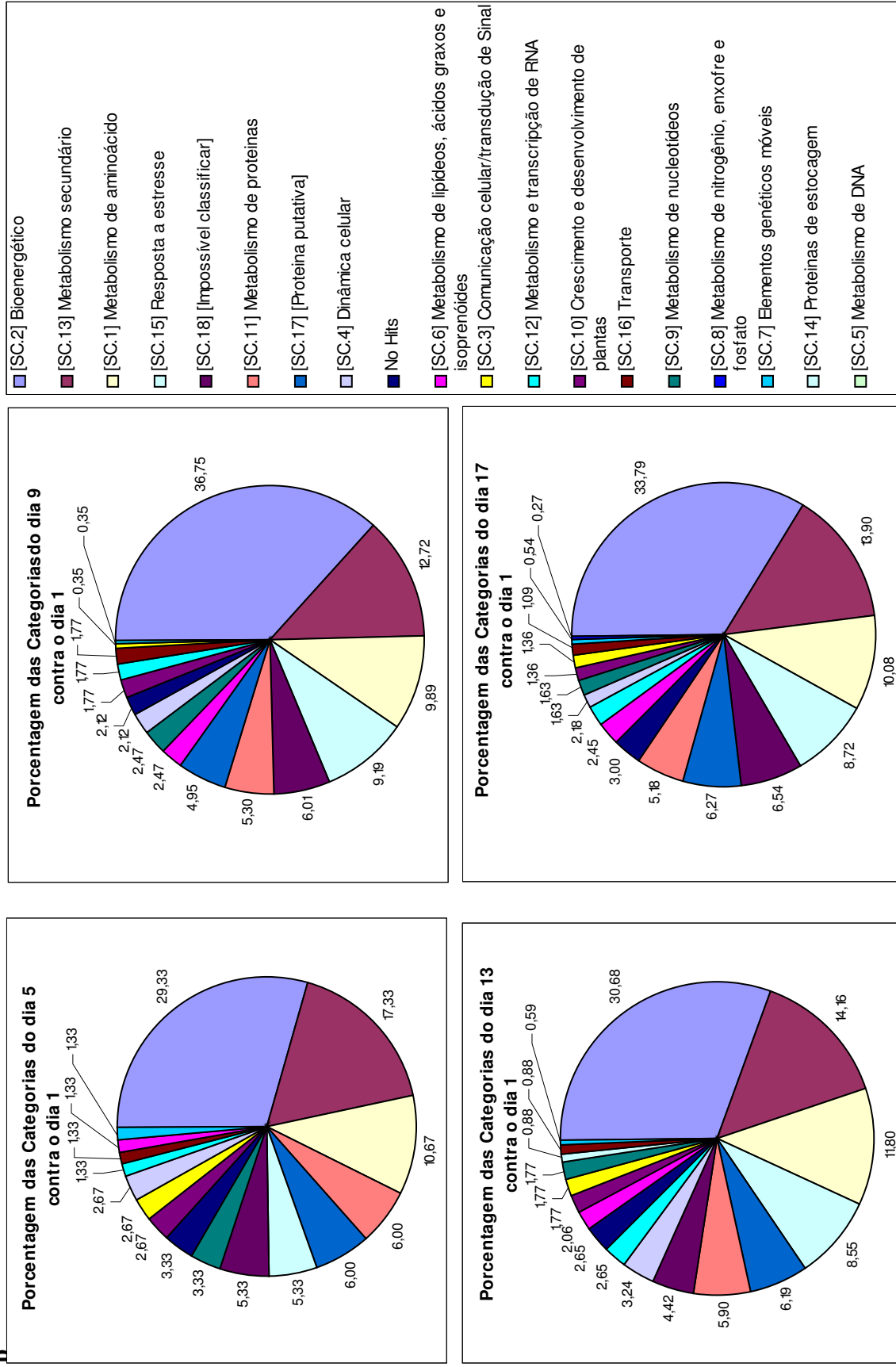
## 5.5 Análise por Ferramentas de Bioinformática

### 5.5.1 Categorização dos Dados

Após a realização da análise estatística, as seqüências utilizadas neste trabalho foram submetidas aos bancos do NCBI para identificação da proteína codificada (BLASTx), as quais foram agrupadas de acordo com a categorização proposta por TELLES *et al.* (2001), como mostrado na **Figura 8**.

Os dados da **Figura 8** indicaram que as quatro categorias com a maior porcentagem de ESTs expressas nas membranas, em ordem decrescente, foram: [SC.2] Bioenergética, [SC.13] Metabolismo secundário, [SC.1] Metabolismo de aminoácido e para quarta categoria houve uma mudança a partir do dia 5 de estresse hídrico, alterando de [SC.11] Metabolismo de Proteína para [SC.15] Resposta ao Estresse, embora essa diferença no dia 5 seja muito pequena (6,00% e, 5,33% respectivamente).

D



**Figura 8.** Porcentagem das categorias expressas durante os dias de estresse hídrico.

## **5.6 Expressão dos genes na Categoria de Bioenergética: Via do Metabolismo de Açúcar e Amido**

Os resultados indicaram que a categoria de Bioenergética foi a que apresentou a maior porcentagem de ESTs expressas em todos os dias de estresse hídrico. Como a parte da cana-de-açúcar estudada foi o palmito, que refere-se a uma região composta essencialmente de células meristemática e estritamente dependentes dos produtos da fotossíntese (açúcares), enfatizou-se as proteínas relacionadas a Via do metabolismo de Açúcar e Amido. Esta via contém 34 ESTs, tais como a Invertase de parede celular, sacarose fosfato sintase e sacarose fosfato fosfatase (síntese de sacarose); trealose fosfato sintase e trealose fosfato fosfatase (síntese da trealose) e a hexoquinase (**Tabela 2**).



Tabela 2. ESTs Diferencialmente Expressas na Categoria de Bioenergética

Identificação Clone	Nº de Acesso	E Value	Proteína	Dias de Estresse Hídrico (M)			
				05_01	09_01	13_01	17_01
<b>Ciclo do Ácido Cítrico</b>							
SCCCL3001C03	gi 11066954 gb AAG28777.1	2,00E-95	citrate synthase	----	----	2,47	1,49
SCEZR3016F04	gi 3309243 gb AAC26045.1	8,00E-57	aconitase-iron regulated protein 1	----	1,83	2,83	3,24
SCEPSD2004C02	gi 66845457 gb EAL85792.1	1,00E-23	fumarate hydratase, putative	7,08	5,90	5,73	5,49
SCJFAD1010B09	gi 50941891 ref XP_480473.1	e-127	putative Aconitate hydratase	3,59	3,62	4,30	4,31
SCCCCL3003F11	gi 50251779 dbj BAD27711.1		Citrate synthase, glyoxysomal precursor (GCS)	----	2,67	3,19	3,44
SCRULB1057H06	gi 3660471 emb CA05025.1	6,00E-12	succinate dehydrogenase flavoprotein alpha subunit	----	----	----	-1,57
SCACRZ3109C06	gi 50940213 ref XP_479634.1	2,00E-64	putative 2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 subunit	----	1,26	1,32	1,28
<b>Rota Oxidativa das Pentoses Fosfato</b>							
SCMCLB2083F10	gi 3342800 gb AAC27702.1	4,00E-85	putative cytosolic 6-phosphogluconate dehydrogenase	----	1,92	2,26	2,89
SCJFSB1014D05	gi 34305475 gb AAQ63570.1	2,00E-25	plastidic alpha 1,4-glucan phosphorylase	----	1,92	1,69	1,65
SCCCCL3120A02	gi 34895322 ref NP_909004.1	3,00E-84	putative plastidic albolase	5,85	2,18	2,61	3,08
SCEZRZ3053B12	gi 38426301 gb AAP33506.2	7,00E-83	cytosolic 6-phosphogluconate dehydrogenase	----	-2,89	-3,55	-2,88
SCEZAD1081F03	gi 34897872 ref NP_910282.1	2,00E-63	putative 6-phosphogluconate dehydrogenase	----	1,27	----	1,49
SCJFLR1074D04	gi 50725145 dbj BAD33762.1	2,00E-55	putative 6-phosphogluconolactonase	----	-1,21	----	-1,54
SCVPRZ3028A01	gi 51832613 gb AAB99957.2	5,00E-93	plastid starch synthase I precursor	----	1,90	1,59	1,54
SCJSTS3085B04	gi 37531886 ref NP_920245.1	4,00E-49	putative phosphoglucomutase	----	----	----	-4,51
SCJFST1047D08	gi 6007803 gb AAF01048.1	4,00E-94	D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase	----	----	----	1,38
SCR LSD2013B10	gi 29409963 emb CAD80254.1	1,00E-38	6-phosphogluconate dehydrogenase	7,51	5,16	----	7,28
SCJFRZ3C08A12	gi 57900129 dbj BAD88191.1	e-106	putative transaldolase	----	-1,95	-2,67	-1,35
<b>Via do Metabolismo de Açúcar e amido</b>							
SCJSTS3130H07	gi 21326129 gb AAM47595.1	7,00E-45	putative UDP-glucose dehydrogenase	----	-1,83	-1,43	----
SCJFAD1C09G02	gi 22273 emb CAA39454.1	7E-20	enolase	----	1,17	2,25	1,69
SCSFAD1068G10	gi 13892040 gb AAK39640.1	e-101	ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	----	1,49	4,80	1,43
SCJFLR1013B06	gi 14149116 dbj BAB55655.1	1,00E-37	fructose-6-phosphate 2-kinase	----	----	1,24	1,72
WSJFLR3090D11	gi 1121508 emb CAC14890.1	e-131	d-TDP-glucose dehydratase	-2,25	-4,57	-4,32	-4,74
SCCCLR1076F08	gi 3136313 gb AAC16655.1	4,00E-67	soluble acid invertase	----	----	-1,48	----
SCSGFL1081C10	gi 57900173 dbj BAD88258.1	3,00E-67	cell wall invertase	----	-6,13	----	----
SCEQSD1077C11	gi 3372518 gb AAC28320.1	3,00E-67	invertase	----	----	----	2,10
SCJLLR1108A12	gi 50909331 ref XP_466154.1	2,00E-56	putative alkaline/neutral invertase	----	6,59	7,28	6,52
SCCCRT106D06	gi 31872120 gb AAP59437.1	4,00E-41	cell wall invertase	----	0,00	0,00	0,00
SCMCL6055H11	gi 32130594 gb AAP68981.1	e-105	UDP-glucose-4-epimerase	1,49	1,39	2,81	3,78

Tabela 2. Continuação

Identificação Clone	Nº de Acesso	E Value	<sup>b</sup> Dias de Estresse Hídrico (M)				
			05_01	09_01	13_01	17_01	
SCBFR11064F09	gij50945743 ref XP_482399.1	7,42E-09	5,76	5,59	6,35	5,98	
SCJLLR1011A09	gij50252610 dbj BAD28781.1	1,00E-69	1,42	2,01	2,16	2,29	
SCRRLR3039A02	gij50253004 dbj BAD29254.1	2,00E-74		3,18	3,11	3,06	
SCEPLR1051A07	gij50911509 ref XP_467162.1	e-103				1,93	
SCACAD1036E04	gij69205229 gb AAZ03743.1	2,00E-57	3,64	4,00	5,15	3,32	
SCUTRZ3103C01	gij11854378 dbj BAA19242.1	1,00E-23		-6,43			
SCACLR1126C12	gij50931573 ref XP_475314.1	8,00E-41				-3,36	
SCMCR21204F04	gij37536152 ref NP_922378.1	8,00E-29		2,27	2,66		
SCSGFL5C04C01	gij51535096 dbj BAD37685.1	2,00E-42		-2,35	-3,09	-2,98	
SCMCLV1030C12	gij62732953 gb AAX95072.1	4,00E-60					
SCBFR11072B07	gij52076544 dbj BAD45421.1	3,00E-71	-2,21				
SCCCLB1021B05	gij50918261 ref XP_469527.1	4,00E-20		-6,98			
SCQGAM2110H12	gij50912091 ref XP_467453.1	2,00E-51			-2,68	-2,49	
SCJLRT1017B04	gij57863790 gb AAS86398.2	7,00E-56			-5,44	-3,48	
SCSBAD1130A08	gij113621 sp P08440	5E-31		1,56	1,21	1,53	
SCAGSB1089G09	gij3057120 gb AAC14014.1	2,00E-54		-2,09	-1,82	-2,19	
SCEPAM1016C08	gij37534706 ref NP_921655.1	e-122		-1,36		-4,80	
SCAGCL6015C04	gij117646328 gb AAL40942.1	8,00E-90		-3,21		-2,63	
SCEQRT2096B04	gij34902740 ref NP_912716.1	2,00E-74			-1,60	-1,68	
SCEPAM2053H08	gij5689138 dbj BAA82828.1	e-136		-2,11		-2,14	
SCEZAD1C08A07	gij474408 emb CAA53075.1	3,00E-92				1,86	
SCEPRZ1009B12	gij34908172 ref NP_915433.1	1,00E-17			1,44		
<b>Reações do Ciclo de Calvin e Biossíntese de Sacarose</b>							
SCACAM1071H08	gij50725810 dbj BAD33340.1	1,00E-70		-2,39		-2,61	
SCACSB1123E03	gij50900276 ref XP_450926.1	2,00E-51		1,77		1,45	
<b>Reações do Ciclo Fotossintético C4</b>							
SCSFSB1068C01	gij18460985 gb AAK91502.1	3,00E-50		2,72			
SCCCCL6C01G07	gij3550549 emb CAA06247.1	1,00E-74	1,77			2,09	
SCRFSD2023E06	gij11518406 emb CAA93169.1	5,00E-18	8,79	6,83	7,90	5,93	
SCJFLR1017A10	gij23306662 gb AAN15222.1	7,00E-66			-2,41	-2,12	
SCJLFL1049D08	gij50919867 ref XP_470294.1	6,00E-60	1,24		1,25		
SCJFSB1012G07	gij3914607 sp Q41373	8,00E-82		2,69			
<b>Reações do Ciclo Oxidativo Fotossintético C2 do Carbono</b>							
SCRLSD2009A12	gij50934283 ref XP_476669.1	4,00E-93			1,26		
SCSGLV1011A08	gij21464596 emb CAC85930.1	6,00E-41	0,87	-5,10	-6,37		

<sup>b</sup>Dias de Estresse Hídrico (M)<sup>a</sup>Proteína

putative trehalose-6-phosphate synthase  
 putative trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase  
 putative phosphofructokinase  
 trehalose-6-phosphate phosphatase  
 sucrose phosphate phosphatase  
 sucrose-phosphate synthase  
 putative fructose-1,6-bisphosphatase  
 putative trehalase  
 putative trehalose-phosphatase  
 Fructose-bisphosphate aldolase class-I  
 putative cytosolic phosphoglycerate kinase 1  
 phosphoglucomutase  
 P2-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase  
 putative hexokinase 1  
 ALF\_MAIZE Fructose-bisphosphate aldolase  
 starch synthase DULL1  
 putative soluble starch synthase II-1  
 putative starch synthase III  
 granule binding starch synthase II precursor  
 starch branching enzyme rbe4  
 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN)  
 putative triosephosphate isomerase

Triosephosphate isomerase, chloroplast precursor  
 putative glucose-6-phosphate isomerase

NADP-dependent malic enzyme  
 cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase  
 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit  
 putative C4 phosphoenolpyruvate carboxylase  
 ribulose-5-phosphate-3-epimerase  
 Ribulose biphosphate carboxylase small chain

putative glycolate oxidase  
 putative phosphoenolpyruvate carboxylase

**Tabela 2. Continuação**

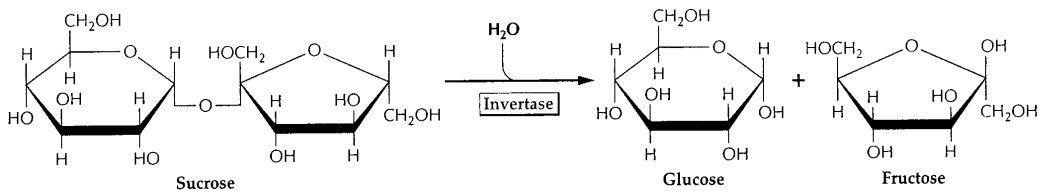
Identificação Clone	Nº de Acesso	E Value	ªProteína	bDias de Estresse Hídrico (M)			
				05_01	09_01	13_01	17_01
<b>Ciclo do Glicoxilato</b>							
SCCCL6005D11	gij50937953 ref XP_478504.1	1,00E-85	putative isocitrate lyase	—	3,27	2,86	1,88
SCJFRT1011E04	gij52353538 gb AAU44104.1	2,00E-41	isocitrate dehydrogenase	—	-1,95	-1,79	-2,03
SCCCL4001F08	gij532625 gb AAB04118.1	3,00E-97	malate synthase	—	1,21	1,92	2,57
<b>Assimilação do Amônio</b>							
SCJFHR1C05A07	gij34911932 ref NP_917313.1	e-124	NADP-specific isocitrate dehydrogenase	—	—	1,69	1,99
<b>Modificação da Parede Celular</b>							
SCAGCL6014H06	gij255553524 dbj BAC24804.1	3,00E-14	UDP-galactose 4-epimerase-like protein	-1,67	-1,97	—	-2,07
<b>Biossíntese de Esteróides</b>							
SCQGR13045F04	gij50905227 ref XP_464102.1	e-113	GHMP kinase-like protein	—	—	—	-1,45
<b>Metabolismo de Galactose</b>							
SCEPAM2054E04	gij50919609 ref XP_470165.1	4,00E-95	putative galactose kinase	—	-0,96	—	-1,52
SCCCLR1C11G09	gij595780 gb AAA56741.1	2,00E-23	lacZ alpha peptide	—	-1,36	-1,29	-2,31
<b>Metabolismo de Glicoxilato e Decarboxilato</b>							
SCJLRT1013H04	gij50939277 ref XP_479166.1	3,00E-91	putative (S)-2-hydroxy-acid oxidase	—	-1,38	-1,63	-3,11
<b>Metabolismo de Frutose e Manose</b>							
SCSGRT2066A07	gij50944555 ref XP_481805.1	1,00E-75	putative pyrophosphate-dependent phosphofructokinase	—	-1,92	-1,82	-2,11
SCJFRT2054B05	gij55773673 dbj BAD72231.1	1,00E-44	putative 6-phospho-1-fructokinase	—	1,80	3,06	2,31
<b>Metabolismo de Glicina, Serina e Teonina</b>							
WSJFLR4018D08	gij37222051 gb AAQ17040.2	e-130	pollen 2-phosphoglycerate dehydrogenase 2 precursor	6,99	—	6,75	5,82
<b>Metabolismo Pirimidina</b>							
SCEZAM2096E09	gij13195430 gb AAK15695.1	3,00E-50	alpha 1,4-glucan phosphorylase L isozyme: alpha glucan	—	—	1,80	1,73

ªProteína: indicação da suposta função dos produtos dos genes.

bDias de Estresse Hídrico (M): cada valor representa a média da proporção entre a intensidade relativa normalizada de cada intervalo de estresse hídrico contrastado com o controle.

### 5.6.1 Invertase de parede celular

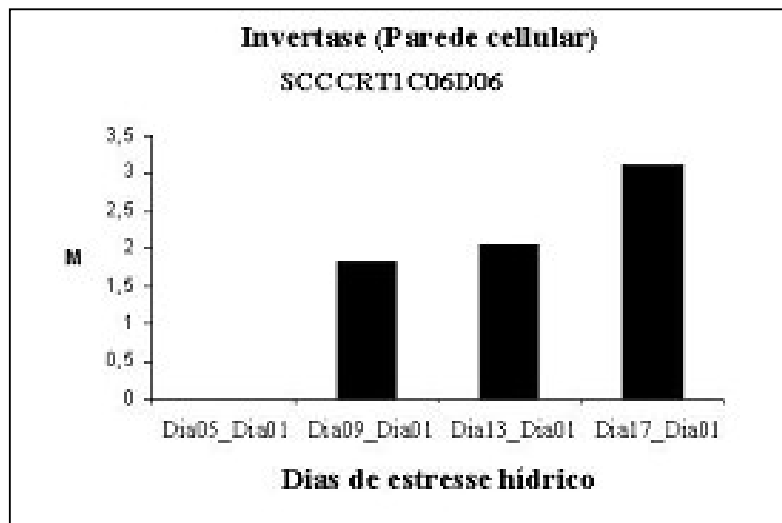
Existem duas formas de invertase, uma com um pH ácido ótimo, e a outra que inicia muitas atividades sobre condições alcalinas. Estas formas têm funções em diferentes compartimentos celulares: invertase alcalina no citosol e a invertase ácida no vacúolo e na parede celular (BUCHANAN *et al.*, 2000). A reação catalisada pela invertase é irreversível na reação de hidrólise da sacarose (**Figura 9**).



**Figura 9.** Degradação da Sacarose pela Invertase (Fonte: BUCHANAN *et al.*, 2000).

Ao chegar à célula de armazenamento no parênquima, a sacarose é invertida através da mediação de uma invertase ácida ligada à parede celular. Os produtos, frutose e glicose, prontamente se difundem de fora para dentro da área metabólica, e com igual facilidade podem se difundir de volta para o meio externo (MOORE, 1995).

A **Figura 10** mostra que a EST (SCCCRT1C06D06) que codifica a enzima invertase de parede celular (INV EC 3.2.1.26) foi induzida a partir do nono dia, indicando que provavelmente neste período houve um aumento na hidrólise da sacarose.

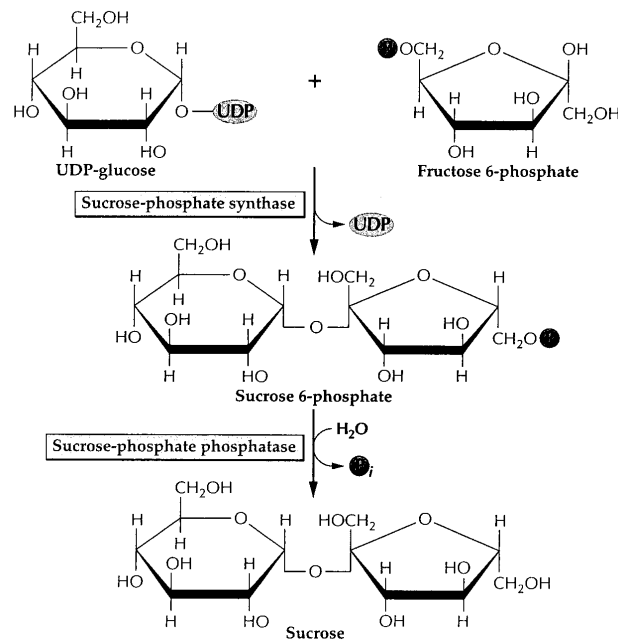


**Figura 10.** Indução da EST que codifica a enzima Invertase de Parece Celular.

De acordo com o resultado obtido neste trabalho, alguns autores acreditam que a invertase de parede celular seja necessária para a absorção da sacarose pela célula, ao hidrolisá-la em açúcares menores (MOORE, 1995; ALEXANDER, 1973). Segundo ALBERTSON *et al.* (2001), a invertase ácida de parede celular ainda é muito pouco caracterizada na cana-de-açúcar e em outras espécies, tendo sido objeto de estudo de poucas pesquisas, principalmente se comparada com a Invertase Ácida Solúvel (SAI).

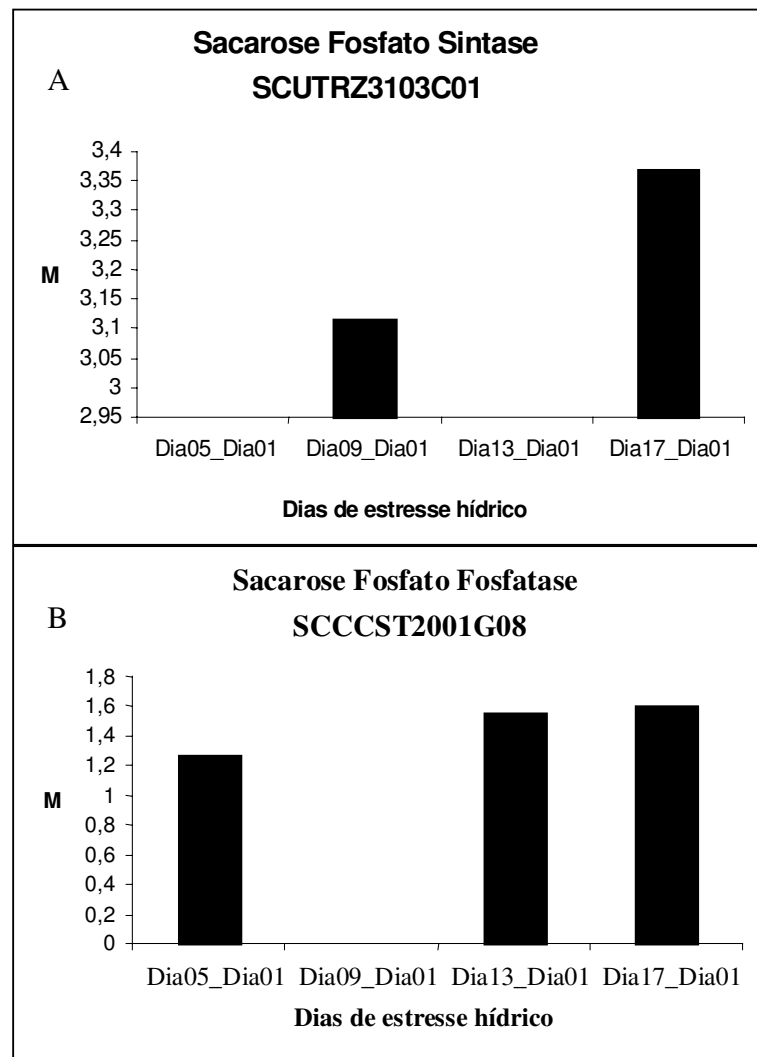
### 5.6.2 Síntese da Sacarose

A sacarose fosfato sintase (SFS EC:2.4.1.14) é a principal enzima que controla a biossíntese de açúcar em plantas superiores, catalizando a reação de formação de sacarose-6-fosfato a partir da frutose-6-fosfato e UDP-glicose. Na segunda reação, a enzima sacarose fosfato fosfatase (SFF EC 3.1.3.24) fosforila a sacarose-6-fosfato em sacarose (HUBER, S. C. & HUBER, J. L., 1996) (**Figura 11**).



**Figura 11.** Síntese da Sacarose pela Sacarose Fosfato Sintase e Sacarose Fosfato Fosfatase (Fonte: BUCHANAN *et al.*, 2000).

Neste trabalho, uma EST (SCCST2001G08) que codifica a enzima SFS mostrou-se induzida nos dias 9 e 17 e a EST (SCUTRZ3103C01) que codifica a enzima SFF foi induzida em todos os dias, indicando que a via de síntese de sacarose provavelmente está ativa (**Figura 12**).



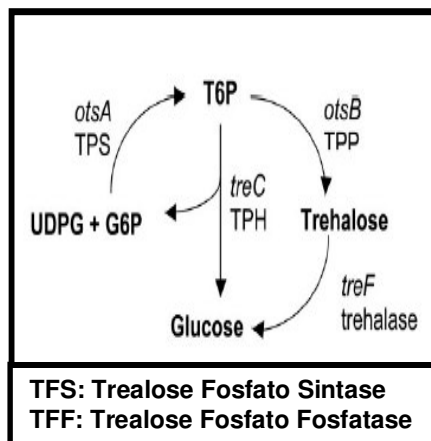
**Figura 12.** Indução das ESTs que codificam as enzimas (A) SFS e (B) SFF.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com INDRA DEWI & SUGIHARTO (2001), que verificaram um aumento no conteúdo de sacarose de quase três vezes durante os nove dias em plantas de cana-de-açúcar não irrigadas. Esta mudança no conteúdo de sacarose foi devido ao aumento da atividade da SPS. Concomitantemente, este aumento ativa a principal enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP) que assimila carbono em células fotossintéticas C4. Por outro lado, a enzima que assimila o nitrogênio, a nitrato redutase, diminuiu durante este período. Estes resultados implicam que o déficit hídrico aumenta as enzimas que assimilam o

carbono, especialmente a SPS, para aumentar o conteúdo de sacarose que atua como um osmoregulador e mantém um gradiente potencial de água favorável através da membrana celular (SUGIHARTO, 2004). Estudos em espécies de *Populus* têm verificado um aumento da síntese de sacarose e outros açúcares solúveis, em resposta ao estresse hídrico, assim como acúmulo de proteínas de estresse hídrico e sacarose sintase (PELAH *et al.*, 1997).

### 5.6.3 Biossíntese de Trealose

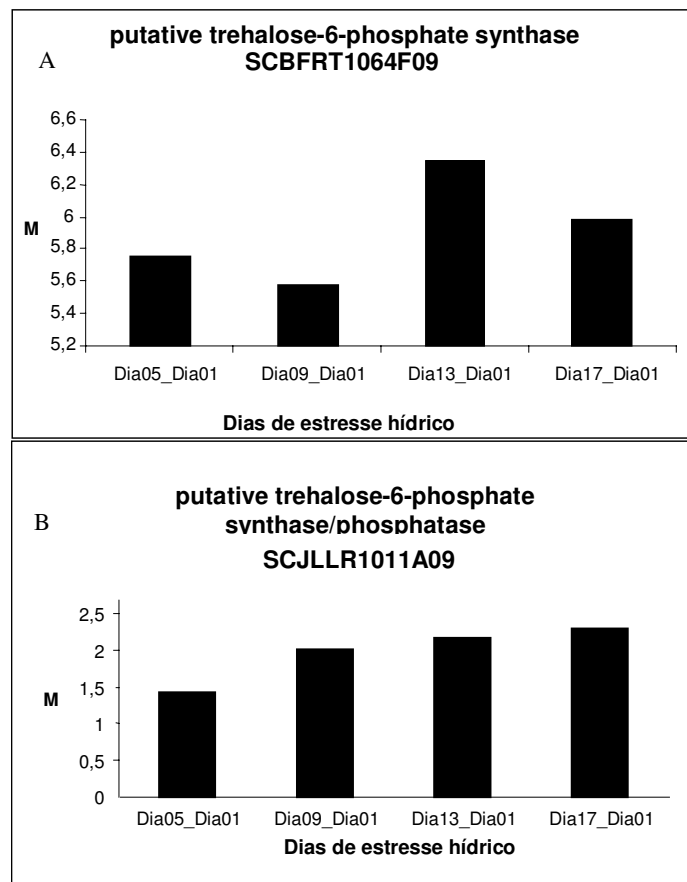
Com o acúmulo de sacarose no meristema apical, a planta percebe que está sofrendo algum tipo de estresse, e com isso induz a síntese de trealose. Este dissacarídeo não-redutor é um açúcar raro em plantas e é o mais efetivo osmoprotetor em termos de concentração mínima requerida (CROWE *et al.*, 1992). Nas plantas superiores a trealose não é geralmente acumulada, sendo até mesmo considerado tóxica. A via de biossíntese da trealose ocorre em duas reações, sendo a primeira catalisada pela enzima trealose fosfato sintase (TFS EC 2.4.1.15) e envolve a transferência de glicose a partir de UDP-glicose a glicose-6-fosfato, obtendo desta forma a trealose-6-fosfato (T6F) e uridina difosfato (UDP). Na segunda reação, a enzima trealose fosfato fosfatase (TFF EC 3.1.3.12) então converte a trealose-6-fosfato em trealose livre (CHEN & HADDAD, 2004; SCHLUEPMANN *et al.*, 2004; KOSMAS *et al.*, 2006) (**Figura 13**).



**Figura 13.** Biossíntese da Trealose pela enzima TFS e TFF.



A **Figura 14** mostrou a indução em todos os dias de estresse hídrico das ESTs que codificam a enzimas TFS (SCBFRT1064F09) e TFS/F (SCJLLR1011A09). Segundo NODA (2003), que trabalhou com a mesma variedade e tecido de cana-de-açúcar (SP80-3280) submetida ao estresse hídrico, utilizando a técnica de biblioteca de cDNA observou que o nível de expressão relativa da TFS foi 6,5 vezes maior em suas bibliotecas (LR3 e LR4), quando comparadas com as bibliotecas do projeto SUCEST não estressadas (LRsc). DEDEMO (2006), que utilizou a técnica de macroarranjo com cDNA de folhas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse hídrico, observou a indução da enzima TFS na variedade tolerante (SP80-2847) e sensível (SP90-1638). Já a enzima TFF foi reprimida na variedade tolerante e induzida na sensível.



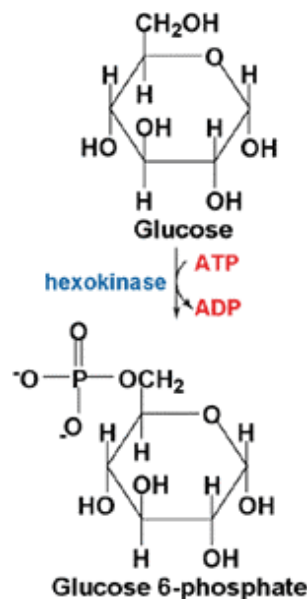
**Figura 14.** Indução das ESTs que codificam as enzimas (A) TFS e (B)TFS/F.

KOSMAS *et al.* (2006) observaram que o gene para a enzima trealose-6-fosfato sintase compreende três regiões codificantes, apresentando uma única cópia no genoma de algodão revelado em análises de Southern blot. Os níveis de expressão, determinados semi-quantitativamente, indicaram que o gene esteve expresso em todos os tecidos do algodoeiro, todos sob as mesmas condições de disponibilidade de água, sendo os maiores níveis de expressão observados principalmente nas folhas e em raízes estressadas quando comparados com os tecidos não estressados.

ROMERO *et al.* (1997), trabalhando com os genes de levedura CIFI em plantas transgênicas de tabaco, observaram que a codificação da trealose-6-fosfato sintase é suficiente para determinar o acúmulo de trealose e esta acumulação altera o metabolismo de carboidrato, induz mudanças morfológicas e provável tolerância à seca.

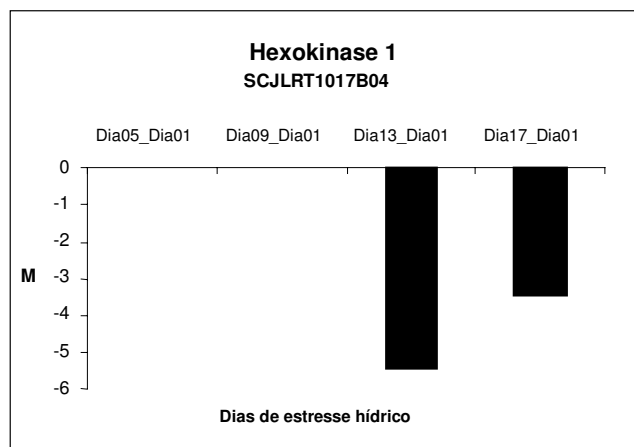
#### 5.6.4 Hexoquinase

No primeiro passo da glicólise, a glicose é ativada para as reações subsequentes pela sua fosforilação em C-6 para liberar a glicose-6-fosfato; o doador de fosfato é o ATP. Esta reação é irreversível sob as condições intracelulares e é catalisada pela hexoquinase (HXQ EC:2.7.1.1) (**Figura 15**).



**Figura 15.** Uso de ATP pela Hexoquinase para fosforilar a glicose.

O nome comum quinase é aplicado a todas as enzimas que catalisam a transferência do grupo fosfato terminal do ATP para um receptor nucleofílico qualquer de uma hexose, no caso da hexoquinase. A hexoquinase catalisa a fosforilação não apenas da D-glicose, mas também de certas outras hexose comuns, como a D-frutose e a D-manose (NELSON & COX, 2002). Neste trabalho, uma EST (SCJLRT1017E04) que codifica a enzima HXQ foi reprimida (**Figura 16**).



**Figura 16.** Repressão da EST que codifica a enzima Hexoquinase.

Este resultado confirmou o obtido com as enzimas TFS e TFS/F que foram induzidas e provavelmente houve uma produção de moléculas de trealose. Quando há um aumento da trealose, ocorre uma diminuição na fosforilação das moléculas de glicose e frutose pela enzima hexoquinase (HXQ), sugerindo a regulação da via da glicólise visto que esta enzima atua na etapa inicial do processo respiratório. BLASQUES *et al.* (1993) observaram em leveduras que a trealose-6-fosfato inibe a fosforilação dos açúcares. Tal situação condiz com o estado de estresse hídrico em que a planta se encontra, restringindo o rendimento fotossintético (MUNNÉ-BOSCH *et al.*, 2001, KRIEGER-LISZKAY, 2004) e sinalizando os tecidos meristemáticos sobre uma redução na atividade de crescimento (GIBSON, 2005).

### 5.7 Expressão dos Genes na Categoria do Metabolismo Secundário: Metabolismo da Glicina Betaína

Os produtos secundários naturais influenciam nas interações ecológicas entre a planta e o ambiente (BUCHANAN *et al.*, 2000).

As betaínas são compostos de amônio quaternário em que o átomo do nitrogênio é metilado totalmente. As betaínas mais comuns nas plantas incluem a glicina betaína, prolina betaína,  $\beta$ -alanina betaína, colina-O-sulfato e 3-dimetilsulfo-niopropionato (RHODES & HANSON, 1993; MCNEIL *et al.*, 1999). O acúmulo de glicina betaína é associada a uma regulação positiva da expressão do gene da colina monooxigenase (CMO) e da betaína aldeído desidrogenase (BADH) concomitantemente, assim, conduzindo a uma atividade enzimática elevada.

Na categoria do metabolismo secundário foram expressas 2 ESTs correspondente a via do metabolismo de glicina betaína, sendo estas: colina monooxigenase e betaína aldeído desidrogenase (**Tabela 3**).

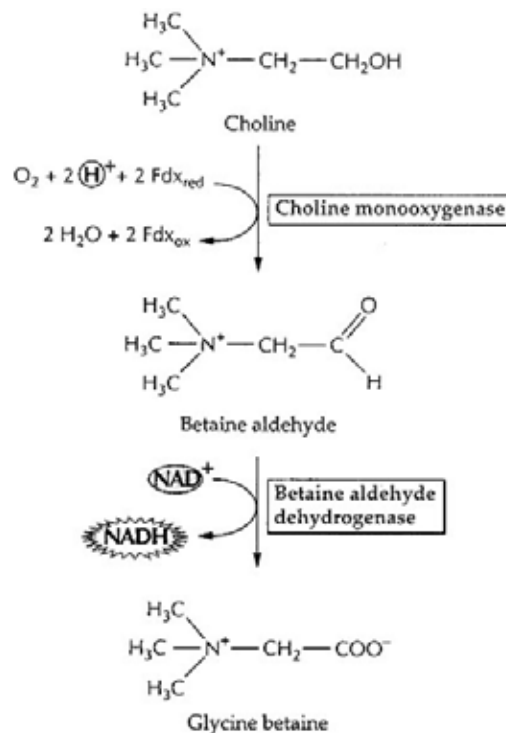
**Tabela 3. ESTs Diferencialmente Expressas na Categoria de Metabolismo Secundário**

Identificação Clone	Nº de Acesso	E Value	Proteína	Dias de Estresse Hídrico (M)				
				05_01	09_01	13_01	17_01	17_01
<b>Metabolismo do Piruvato</b>								
SCJLRT1014E08	gi 50919645 ref XP_470183.1	7,00E-47	Putative AMP-binding protein	-3,03	1,71	-2,51	- - - -	
<b>Biossíntese de Esteróides</b>								
SCUTAM2006E01	gi 1667389 emb CAA70440.1	3,00E-39	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A	7,71	6,91	- - - -	- - - -	
<b>Metabolismo de Fenilalanina</b>								
SCCST3004G06	gi 50910713 ref XP_466845.1	1,00E-47	phenylalanine ammonia-lyase	7,63	- - - -	7,49	8,37	
<b>Metabolismo do Glutamato</b>								
SCACSB1117F02	gi 21321781 gb AAM47304.1	5,00E-77	putative glutamate carboxylase	- - - -	1,87	1,64	2,17	
<b>Metabolismo de Glicina, Serina e Teonina</b>								
SCJFHR1030B02	gi 33300598 emb CAE17671.1	1,00E-96	choline monoxygenase	- - - -	- - - -	1,63	1,49	
SCQGHR1013A09	gi 50950101 dbj BAD34957.1	e-110	betaine aldehyde dehydrogenase	-2,01	1,03	1,05	1,10	
<b>Biossíntese de Coumarim e Fenilpropanóides</b>								
SCEZRZ3127E03	gi 34398680 gb AAQ67347.1	6,00E-40	caffeic acid 3-O-methyltransferase	- - - -	-2,79	-3,63	-3,40	
SCJFAD1C09G05	gi 34907714 ref NP_915204.1	8,00E-66	putative 4-coumarate-CoA ligase	-2,72	- - - -	-2,09	-2,13	
SCAGLR2033C05	gi 50252447 dbj BAD28601.1	3,00E-68	cinnamyl alcohol dehydrogenase	- - - -	- - - -	-2,42	-1,88	
<b>Metabolismo de Metionina</b>								
SCCCCL3003H05	gi 50910375 ref XP_466676.1	4E-67	S-adenosylmethionine decarboxylase 2	- - - -	- - - -	2,22	2,91	
<b>Metabolismo de Fenilalanina, Tirosina e Triptofano</b>								
SCSGAM2102C02	gi 50915852 ref XP_468390.1	e-105	anthranilate phosphoribosyltransferase	- - - -	- - - -	7,02	10,33	
SCCCSB1003E05	gi 50918343 ref XP_469568.1	2,00E-55	anthranilate synthase beta subunit	- - - -	3,61	3,09	3,12	
<b>Metabolismo do Ascorbato e Aldarato</b>								
SCSFAD1068B09	gi 52077207 dbj BAD46251.1	5,00E-87	monodehydroascorbate reductase	3,44	5,84	6,62	6,45	
<b>Biossíntese de Diterpenóides</b>								
SCRUFL3068H12	gi 27311283 gb AAO00709.1	4,00E-54	putative gibberellin 20-oxidase	4,50	4,38	5,41	4,64	
<b>Biossíntese de Carotenóide</b>								
SCACAD1036F09	gi 54778784 gb AAV39613.1	1,00E-87	carotenoid cleavage dioxygenase	6,87	- - - -	7,67	- - - -	

<sup>a</sup>Proteína: indicação da suposta função dos produtos dos genes.

<sup>b</sup>Dias de Estresse Hídrico (M): cada valor representa a média da proporção entre a intensidade relativa normalizada de cada intervalo de estresse hídrico contrastado com o controle.

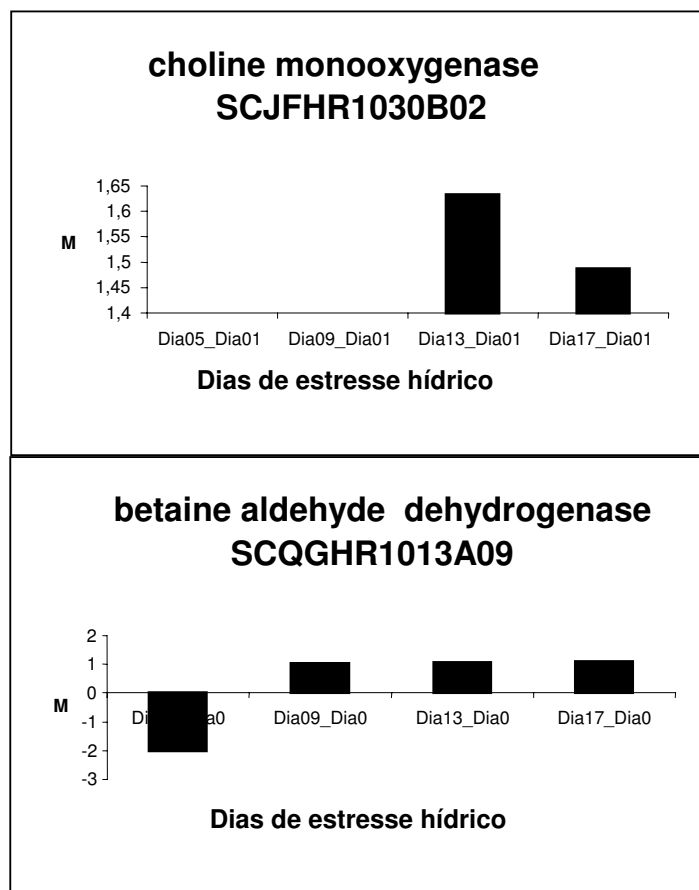
A glicina betaína parece ser um determinante crítico da tolerância ao estresse. Seu acúmulo é induzido sob condições de estresse e essa concentração é correlacionada com o nível da tolerância (RHODES & HANSON, 1993). Em plantas superiores, a glicina betaína é sintetizada a partir da colina em dois passos da via. CMO (EC 1.14.15.7) é a primeira enzima da via que cataliza a oxidação da colina para betaína aldeído, uma monooxigenase incomum dependente de ferredoxina (Fd). No segundo passo, a enzima BADH (EC 1.2.1.8) catalisa a oxidação da betaína aldeído para glicina betaína (KOTCHONI & BARTELS, 2003; BUCHANAN *et al.*, 2000) (**Figura 17**).



**Figura 17.** Esquema da via da síntese da glicina betaína pelas enzimas CMO e BADH (Fonte: BUCHANAN *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as ESTs que codificam as enzimas CMO (SCJFHR1030B02) e BADH (SCQGHR1013A09) que fazem parte da síntese de glicina betaína, foram induzidas nos diferentes dias de estresse hídrico.

Observou-se que houve uma maior indução no dia 13 para a enzima CMO, sendo que no último dia de estresse diminuiu o nível de indução. Com relação a enzima BADH, esta foi reprimida no dia 1 de estresse e nos demais dias ocorreu uma indução constante. A indução destas duas enzimas é um forte indicativo de que a via de síntese da glicina betaína foi ativada, sugerindo que a mesma que é requerida para proteger a planta, mantendo o contrapeso da água entre a célula vegetal e o ambiente e estabilizando as macromoléculas (CHEN & MURATA, 2002; RONTEIN *et al.*, 2002). (Figura 18).



**Figura 18.** Expressão das ESTs que codificam as enzimas (A) CMO e (B) BADH relacionadas a síntese da glicina betaína.

CHA-UM *et al.* (2006) trabalhando com folhas de arroz com baixo potencial hídrico, mostraram que o acúmulo de glicina betaína pode contribuir significativamente para o ajustamento osmótico, facilitando a manutenção do volume do cloroplasto e da capacidade fotossintética. Além disso, segundo estes autores, no estresse salino, o principal papel da glicina betaína seria, provavelmente, o de proteção das células vegetais por meio da preservação do balanço osmótico; da estabilização da estrutura de proteínas-chave, tal como a Rubisco; da proteção do aparato fotossintético e de sua atuação como eliminadora de espécies reativas de oxigênio (ROS). WOOD *et al.* (1996) isolaram dois clones de cDNA de *Sorghum bicolor*, BADH1 e BADH15, que codificam a enzima BADH e observaram que a indução desta enzima sob déficit hídrico aumentou o acúmulo de glicina betaína, o qual contribuiu no ajustamento osmótico da planta.

#### **5.8 Expressão dos Genes da Categoria do Metabolismo de Aminoácido: Metabolismo da Prolina**

A prolina assim como os demais solutos compatíveis apresenta baixo peso molecular, não é carregada em pH neutro, é altamente solúvel e em altas concentrações tem pouco ou nenhum efeito perturbador em interações macromolécula-solvente ou seja, não é tóxica quando em altas concentrações (CHEN & MURATA, 2002). Na categoria do metabolismo de aminoácido, foram expressas 7 ESTs correspondentes a via de síntese da prolina, tais como a  $\Delta$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase, ornitina  $\delta$ -aminotransferase e prolil hidroxilase (**Tabela 4**).



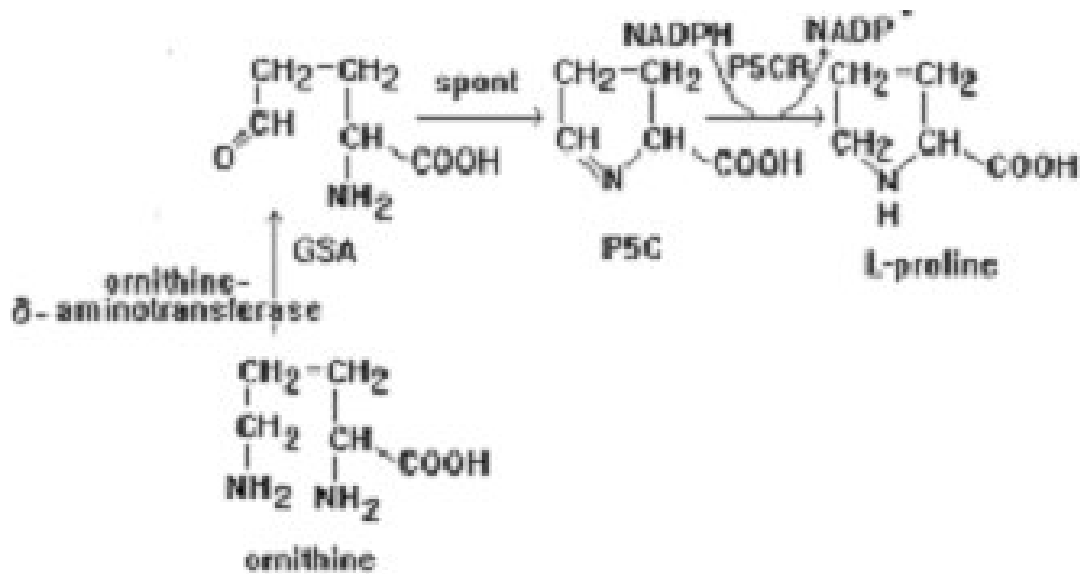
**Tabela 4. ESTs Diferencialmente Expressas na Categoria de Metabolismo de Aminoácido**

Identificação Clone	Nº de Acesso	E Value	Proteína <sup>a</sup>	Dias de Estresse Hídrico (M)					
				05_01	09_01	13_01	17_01	17_01	17_01
<b>Metabolismo do Fenilalanina, Tirosina e Triptofan</b>									
SCMCL6059F09	gi 18481702 gb AAL73524.1	2,00E-69	tryptophan synthase beta-subunit	1,45	1,81	2,89	3,15		
SCRFRZ3054G10	gi 29367397 gb AAO72571.1	2,00E-21	phosphoribosylanthranilate transferase			-1,48			
SCRURT2005G02	gi 50944103 ref XP_481579.1	4,00E-46	indole-3-glycerol phosphate synthase			-1,93			
SCCCFL5058F05	gi 54287488 gb AAV31232.1	2,00E-43	anthranilate phosphoribosyltransferase			1,74	2,01		
SCBFLR1004D10	gi 71841560 gb AAZ43077.1	e-105	anthranilate synthase alpha subunit	1,97		1,61	1,73		
<b>Metabolismo de Alanina e Aspartato</b>									
SCJFRT1008D09	gi 296204 emb CAA49199.1	e-135	alanine aminotransferase			2,33	2,74		
WSJFLR3091H05	gi 53680379 gb AAU89392.1	e-133	glutamine-dependent asparagine synthetase		1,85	2,06			
<b>Metabolismo da Arginina e Prolina</b>									
SCVPRZ3028C09	gi 37703720 gb AAR01225.1	2,00E-26	putative aminotransferase AGD2	-3,60		-6,33	-5,29		
SCCCLR2001F05	gi 46360428 gb AAS89034.1	3,00E-58	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase		-1,25		-1,33		
SCCCRT1003H01	gi 50251688 dbj BAD27593.1	1,00E-60	putative aspartate transaminase			-5,46	-5,66		
SCVPRT2081D09	gi 50916076 ref XP_468502.1	2,00E-47	putative prolyl 4-hydroxylase		2,24				
SCVPRT2083F04	gi 50934891 ref XP_476973.1	4,00E-96	prolyl 4-hydroxylase alpha-1 subunit			1,66	1,86		
SCRLLR1038E09	gi 53749407 gb AAU90265.1	6,00E-74	ornithine-oxo-acid aminotransferase	2,05	2,39				
SCSBHR1052D02	gi 63021725 gb AA Y26524.1	6,00E-32	12-oxo-phytyldienoic acid reductase	-4,92		-7,36			
<b>Degradação da Lisina</b>									
SCRFS1023E05	gi 50902158 ref XP_463512.1	3,00E-54	putative hydroxymethyltransferase		2,06	2,55			
SCRUSB1064C07	gi 50918513 ref XP_469653.1	1,00E-36	glycine hydroxymethyltransferase	0,82	0,72				
<b>Fotossíntese</b>									
SCSFRT2072D06	gi 50919191 ref XP_469992.1	2,00E-90	putative oxidoreductase			-2,76	-1,44		

<sup>a</sup>Proteína: indicação da suposta função dos produtos dos genes.

<sup>b</sup>Dias de Estresse Hídrico (M): cada valor representa a média da proporção entre a intensidade relativa normalizada de cada intervalo de estresse hídrico contrastado com o controle.

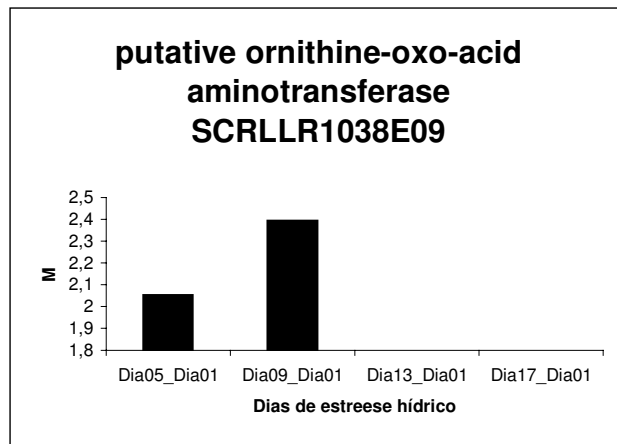
A prolina pode ser sintetizada por duas vias diferentes em plantas, uma originária do glutamato através da ação das enzimas  $\Delta$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS EC 2.7.2.11 + 1.2.1.41) e  $\Delta$ -pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR EC 1.5.1.2) e outra, que utiliza o aminoácido ornitina como precursor, através da ação da enzima ornitina  $\delta$ -aminotransferase ( $\delta$ -OAT, EC 2.6.1.13) (CLAUSSEN, 2005) que retira o grupo amino da ornitina, formando o glutâmico  $\delta$ -semialdeído (GSA) e subseqüentemente consegue convertê-lo para prolina via Pirrolina 5-Carboxilase (P5C) (KISHOR *et al.*, 2005) (**Figura 19**).



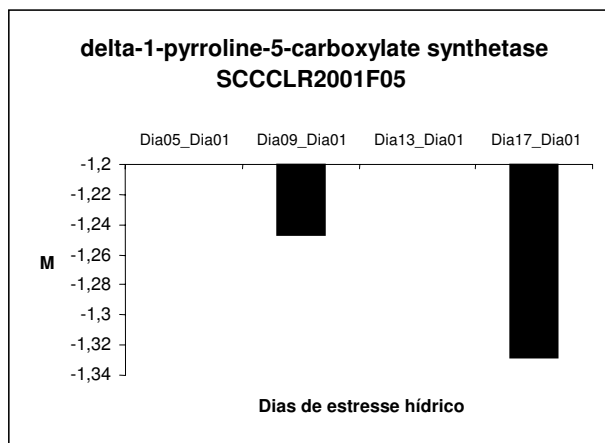
**Figura 19.** Via alternativa da síntese de prolina em plantas (Fonte: BUCHANAN *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos indicaram que na variedade de cana-de-açúcar SP80-3280, submetida ao estresse hídrico nos diferentes dias, após as análises estatísticas dos dados de macroarranjos, uma EST (SCRLLR1038E09) similar ao gene da biossíntese do osmoprotetor prolina que codifica a enzima OAT encontra-se induzida (**Figura 20**). Outra EST (SCCCLR2001F05) que codifica a enzima P5CS encontra-se reprimida (**Figura 21**). Esta enzima catalisa a conversão do L-Glutamato em  $\gamma$ -glutamil fosfato que é convertido em GSA pela enzima GSA redutase NADPH-dependente e

este espontaneamente cicla para a forma P5C, a qual é convertida em prolina pela enzima P5CR. Há controvérsia sobre a importância das duas vias biossintéticas envolvidas na síntese de P5C. Estudos moleculares sugerem que a escolha da via a ser seguida depende do status de nitrogênio da planta (HARE & CRESS, 1997). Sendo assim, a variedade estudada provavelmente não está sintetizando prolina pela via do glutamato, mas sim pela via alternativa da ornitina.

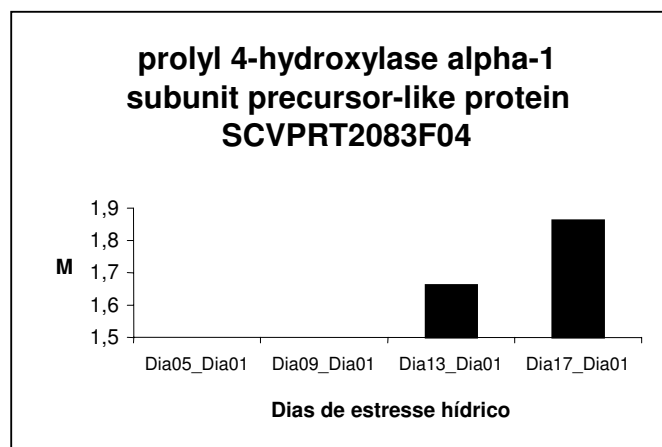


**Figura 20.** Indução da EST que codifica a enzima Ornitina  $\alpha$ -aminotransferase da via alternativa da síntese de Prolina.



**Figura 21.** Repressão da EST que codifica a enzima P5CS.

HARE & CRESS (1997) observaram em plântulas de soja sob estresse salino ou por seca, que uma diminuição no pH intracelular implica em como um fator capaz de eliminar o acúmulo de prolina em plantas e, devido à síntese de prolina, preveniu uma diminuição na respiração e a remoção do excesso de  $H^+$ . Há relatos na literatura de que a prolina pode ser um componente da cascata de sinalização molecular do estresse e um constituinte principal de proteínas da parede celular de plantas (NEPOMUCENO *et al.*, 2001; DEUSCHLE *et al.*, 2004) e também pode agir na regulação do pH, como um mecanismo para aliviar a acidez citosólica, que é uma condição freqüentemente associada com estresse (CHEN & MURATA, 2002). O acúmulo de prolina é observado sob condições limitadas de água (seca, salinidade ou estresse por frio) e durante processos de dessecação, tal como a maturação do pólen (DEUSCHLE *et al.*, 2004). A enzima prolil hidroxilase (PH, EC 1.14.11.2) é uma dioxigenase vegetal que converte prolina ao aminoácido pouco comum hidroxiprolina. Moléculas contendo hidroxiprolina são encontradas na parede celular de todas as plantas. A síntese da hidroxiprolina, a partir da prolina, difere da síntese de todos os outros aminoácidos, pois a reação ocorre após a prolina ter sido incorporada na proteína e é, portanto, uma reação de modificação pós-traducional. Ela é uma enzima que requer L-ascorbato como um modulador para o aumento de sua atividade (DAVEY *et al.*, 2000). Sendo assim, neste trabalho, observou-se a indução da EST (SCVPRT2083F04) que codifica a PH nos períodos 13 e 17 dias, indicando que está ocorrendo a conversão da prolina em hidroxiprolina (**Figura 22**).



**Figura 22.** Indução da EST que codifica a enzima Prolil Hidroxilase.

Segundo ODA *et al.* (2005) tem sido relatado na literatura que o aminoácido hidroxiprolina, da mesma forma que o aminoácido prolina, atua como osmoprotetor em plantas sob estresse por seca e salinidade, e que GABA e alanina são também produzidos em plantas sob estresse salino. DEDEMO (2006) observou uma EST similar ao gene da enzima PH reprimida na cv sensível de cana-de-açúcar (SP90-1638), durante os dois períodos de estresse hídrico. Em análise estatística comparativa entre as duas variedade nos períodos de estresse, a cv tolerante (SP83-2847) apresentou valores que evidenciaram acúmulo da EST similar a enzima PH. Este resultado pode ser um indício da produção de hidroxiprolina concomitante com a de prolina.

Estudos indicam que a prolina desempenha um importante papel durante o desenvolvimento das plantas, servindo como uma fonte rápida e acessível de energia (PHANG, 1985). Segundo HU *et al.* (1996) a oxidação de uma molécula de prolina fornece 30 ATPs para a célula. Sendo assim, é importante saber como o acúmulo de prolina influencia outras vias de energia relacionadas, bem como no metabolismo de carbono durante e após o período de submissão a estresses abióticos.

## **5.9 Expressão dos Genes na Categoria de Resposta ao Estresse: Biossíntese do Jasmonato**

Todos os órgãos da planta são afetados pelo estresse, mesmo se apenas uma parte limitada da planta foi inicialmente envolvida. A coordenação da resposta de estresse no corpo da planta é realizada pelos hormônios vegetais. Logo que uma parte da planta sofre um distúrbio, ocorrem, como uma resposta não-específica, mudanças no sistema hormonal. Essas mudanças condicionam o metabolismo que tem efeito a curto prazo, no sentido de minimizar o estresse e preservar a vida da planta (LARCHER, 2000). Na categoria de resposta ao estresse foram expressas 3 ESTs correspondentes a via do jasmonato, sendo estas: aleno oxido sintase, aleno oxido redutase e lipoxigenase (**Tabela 5**).

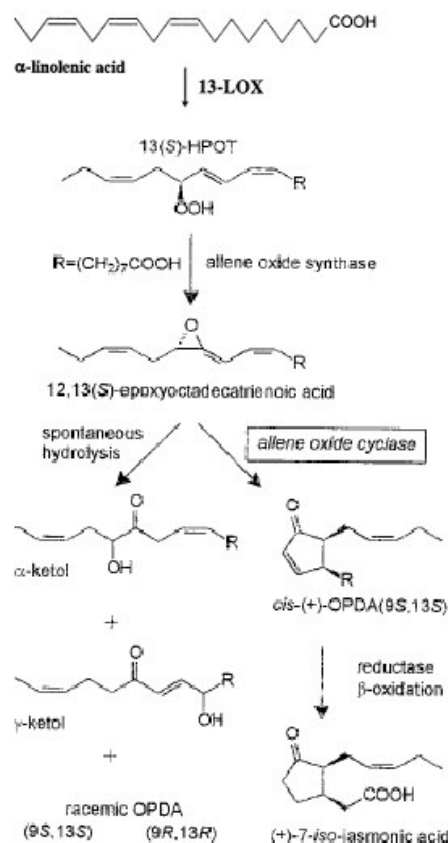
**Tabela 5. ESTs Diferencialmente Expressas na Categoria de Resposta ao Estresse**

Identificação Clone	Nº de Acesso	E Value	ª Proteína	b Dias de Estresse Hídrico (M)					
				05_01	09_01	13_01	17_01	17_01	17_01
<b>Metabolismo ácidos graxos</b>									
SCJFHR1C05G08	gi 1345683 sp P18123	8E-30	CATA3_MAIZE Catalase isozyme 3	-	-	-	3,16	3,36	4,88
SCSGAD1005A06	gi 311239 emb CAA42720.1	e-130	catalase-1	-	-	-	2,48	2,64	2,88
<b>Biossíntese Coumarim e Fenilpropanóides</b>									
WSJFLR3077H02	gi 34398680 gb AAQ67347.1	e-119	caffeic acid 3-O-methyltransferase	-	-	-	-2,07	-3,69	-2,41
WSJFLR3091C11	gi 45685329 gb AAS75424.1	5,00E-99	peroxidase	-	-	-	1,54	2,20	2,14
<b>Metabolismo de Açúcar e Amido</b>									
WSJFLR4002E08	gi 34906578 ref NP_914636.1	4,00E-86	putative beta 1,3-glucanase	-	-	-	-	7,88	10,99
<b>Biossíntese do Jasmonato</b>									
WSJFLR3083B01	gi 39980758 gb AAR33048.1	e-128	allene oxide synthase	-	-	-	1,24	2,12	1,71
SCBGLR1120C06	gi 39980760 gb AAR33049.1	4,00E-83	allene oxide cydase	-2,70	-	-	-	-2,70	-2,89
WSJFLR4011G01	gi 18481649 gb AAL73499.1	e-131	lipoxigenase	-	-	-	2,81	2,94	3,87
<b>Biossíntese de Esteróides</b>									
WSJLR1073H07	gi 50911885 ref XP_467350.1	2,00E-93	putative cytochrome P450	-	-	-	1,46	1,19	1,21
SCJFRZ2030D03	gi 50940323 ref XP_479689.1	6,00E-70	putative P450	-	-	-	4,63	3,72	6,00
SCUTSD1028D09	gi 51535986 dbj BAD38066.1	2,00E-38	e licitor-i inducible cytochrome P450	4,43	4,13	4,80	4,13	4,80	4,62
<b>Biossíntese de Diterpenóides</b>									
SCAGSD1042A10	gi 50937797 ref XP_478426.1	5,00E-69	putative taxane 14b-hydroxylase	-	-	-	-	2,38	3,00
<b>Metabolismo Metionina</b>									
WSJFLR3080D09	gi 51038250 gb AAT94053.1	e-140	S-adenosylmethionine synthetase	-2,70	-	-	-	-3,17	-2,38
<b>Metabolismo Metabolismo de Ascorbato e Aldarato</b>									
SCEZAD1079C07	gi 600116 emb CAA84406.1	e-110	cytosolic ascorbate peroxidase	-	-	-	-2,12	-2,30	-1,20

ªProteína: indicação da suposta função dos produtos dos genes.

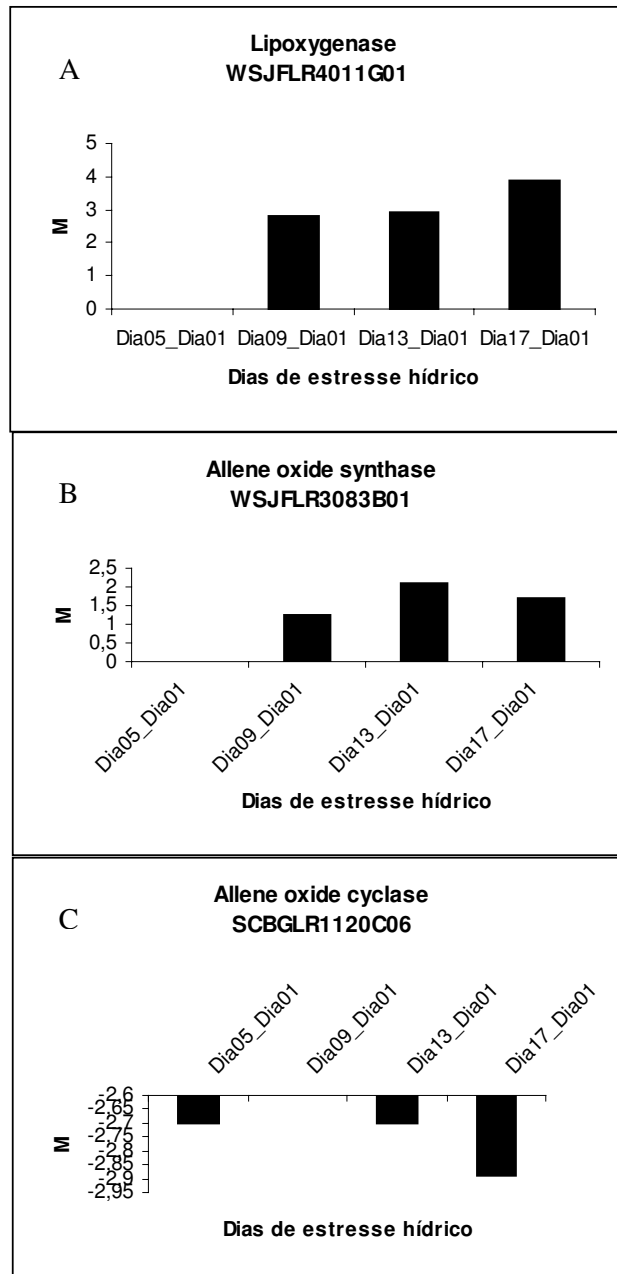
bDias de Estresse Hídrico (M): cada valor representa a média da proporção entre a intensidade relativa normalizada de cada intervalo de estresse hídrico contrastado com o controle.

O Jasmonato (JA) é derivado do ácido linolêico em uma via lipoxigenase-dependente, e está envolvido na regulação de diferentes processos em plantas. Foi identificado como sinal de alteração na expressão de genes em resposta da planta a estresses bióticos e abióticos, assim como de estádios distintos de desenvolvimento de planta (CREELMAN & MULLET, 1997). A biossíntese de JA ocorre via oxilipina, começando com a inserção, catalisada pela lipoxigenase (LOX ID 1.13.11.12), de oxigênio molecular na posição 13 do ácido linolênico, seguido pela desidratação do resultante hidroperóxido ácido gorduroso pela aleno oxido sintase (AOS ID 4.2.1.92), para formar um aleno oxido. Este aleno oxido será então ciclizado pela aleno óxido ciclase (AOC ID 5.3.99.6) para (9*S*,13*S*)-12-oxo-(10,15*Z*)-ácido fitodienoico (OPDA). Após a redução da dupla ligação no anel por uma redutase e três ciclos de  $\beta$ -oxidação, o JA é formado (TURNER et al., 2002) (**Figura 23**).



**Figura 23.** Esquema da biossíntese de Jasmonato. A seqüência de reações após a formação do ácido linolênico hidroperóxido catalisada pela lipoxigenase (LOX) é mostrada (Adaptado de ZIEGLER *et al.*, 2000).

Neste trabalho, as ESTs que codificam as enzimas LOX (WSJFLR4011G01) e AOS (WSJFLR3083E01) mostraram-se induzidas durante os períodos de estresse. No entanto os resultados sugerem que a via de biossíntese de JA não está completamente ativa, pois a EST que codifica a enzima AOC (SCBGLR1120C06) está reprimida (Figura 24).



**Figura 24.** Indução das ESTs que codificam as enzimas (A) LOX e (B) AOS. A EST que codifica a enzima (C) AOC encontra-se reprimida.



Confirmando os resultados obtidos, Noda (2003), trabalhando com a mesma variedade, tecido e período de estresse, observou em bibliotecas de cDNA que as enzimas LOX e AOS também foram induzidas e a enzima AOC não foi encontrada nas bibliotecas. Provavelmente, a indução de LOX pode deixar a planta mais preparada para possíveis ataques de patógenos e acentuar a capacidade para sintetizar outros compostos lipídeo-derivados utilizados na defesa da planta e na proteção contra o desfolhamento por insetos, assim melhorando sua capacidade de sobreviver. WASTERMARK & HAUSE (2002) concluem que todos estes compostos são sinalizadores de respostas das plantas a estresses bióticos e abióticos.

DOMBROWSKI (2003) verificou que ainda não está claro o papel do jasmonato no estresse hídrico e é preciso mais pesquisas para definir sua função. HAUSE *et al.* (2003) sugerem que a elevação dos níveis de OPDA e JA são seguidos pela expressão de genes responsivos ao JA, entre os quais estão os que codificam enzimas da via biosintética do jasmonato, sugerindo um feed-back positivo.

## VI. CONCLUSÕES

1) Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que os macroarranjos de DNA de nylon podem ser utilizados eficientemente e com boa reprodutividade para a análise do perfil de expressão de vários genes, simultaneamente.

2) A EST que codifica a enzima Invertase de parede celular mostrou-se induzida, assim como as duas ESTs da via da síntese da sacarose (sacarose fosfato sintase e sacarose fosfato fosfatase) e duas ESTs da síntese de trealose (trealose fosfato sintase e trealose fosfato sintase/fosfatase). Por outro lado, houve repressão da enzima hexoquinase.

3) Houve indução das ESTs pertencentes as enzimas colina descarboxilase e betaína aldeído desidrogenase, presentes na via de síntese da glicina betaína.

4) Na via do metabolismo de aminoácido, as plantas sob estresse hídrico tiveram a EST correspondente a enzima ornitina  $\delta$ -aminotransferase, enquanto que a EST da  $\Delta$  pirrolina-5-carboxilato sintase foi reprimida durante este período.

5) Na via do jasmonato, as ESTs pertencentes as enzimas aleno oxido sintase e lipoxigenase foram induzidas e a EST da aleno oxido ciclase mostrou-se reprimida.

O presente estudo permitiu identificar diversar ESTs relacionadas à resposta a estresse hídrico em cana-de-açúcar e sugerindo a indução e repressão das principais vias metabólicas relacionadas a resposta a estresses abióticos.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSON, P. L.; PETERS, K. F.; GROF, C. P. L. An improved method for the measurement of the cell wall invertase activity in sugarcane tissue. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 323-328, 2001.

ALEXANDER, A. G. **Sugarcane Physiology**. Amsterdam, Elsevier, 1973. 752p.

BLAZQUEZ, M. A.; LAGUNAS, R.; GANCEDO, C.; GANCEDO, J. M. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. **FEBS Lett**, v. 329, p. 51-54, 1993.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1035-1040, 1993.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000, p. 1158-1203.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000, p.638-673.

CARSON, D. L.; HUCKETT, B. I.; BOTHA, F. C. Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue. **Plant Science**, v. 162, p. 289-300, 2002.

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

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.

CHA-UM, S.; SUPAIBULWATANA, K.; KIRDMANEE, C. Water relation, photosynthetic ability and growth of Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica cv. KDML105) to salt stress by application of exogenous glycinebetaine and choline. **J. Agron. Crop Sci**, v. 192, p. 25-36, 2006.

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

CHEN, Q. & HADDAD, G. G. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 3125-3129, 2004.

CLAUSSEN, W. Proline as a measure of stress in tomato plants. **Plant Science**, v. 168, p. 241-248, 2005.

CLEMENTS, H. F. **Sugarcane crop logging and crop control (Principles and practices)**, Honolulu, The University Press of Hawaii, 1980, 520 p.

CREELMAN, R. A. & MULLET, J. E. Biosynthesis and action of Jasmonates in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 48, p. 355–381, 1997.

CROWE, J. H.; HOEKSTRA, F. A.; CROWE, L. M. Anhydrobiosis. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 54, p. 579–599, 1992.

DAVEY, M. W.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I. J. J.; STRAIN, J. J.; FAVELL, D. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. **J Sci Food Agric.**, v. 80, p. 825-860, 2000.

DEDEMO, G. **Expressão gênica diferencial durante deficit hídrico em duas cultivares de cana-de-açúcar.** 2006. 75f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

DE ROSA JR, F. T. **Análise da expressão gênica em tecidos foliares de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) submetidos ao metiljasmonato.** 2005. 90f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

DESPREZ, T.; AMSELEM, J.; CABOCHE, M.; HOFTE, H. Differential gene expression in Arabidopsis monitored using cDNA arrays. **The Plant Journal**, v. 14, p. 643-652, 1998.

DEUSCHLE, K.; FUNCK, D.; FORLANI, G. The role of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. **Plant Cell**, v. 16, p. 3413-3425, 2004.

DOARES, S. H.; SYROVETS, T.; WEILER, E. W.; RYAN, C. A. Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. **Proceedings of the National Academic of Sciences USA**, v. 92, p. 4095-4098, 1995.

DOMBROWSKI, J. E. Salt Stress Activation of Wound-Related Genes in Tomato Plants. **Plant Physiology**, v. 132, p. 2098–2107, 2003.

FELIX, J. M.; DRUMMOND, R. D.; NOGUEIRA, F. T. S.; ROSA Jr., V. E.; JORGE, R. A.; ARRUDA, P.; MENOSSI, M. Genoma funcional. Uso de arranjos de DNA em náilon para a análise da expressão gênica em larga escala. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 24, p. 60-67, 2002.

FRANCIS, D. & HALFORD, N. G. Nutrient sensing in plant meristems. **Plant Molecular Biology**, v. 60, p. 981–993, 2006.

FREEMAN, W. M.; ROBERTSON, D. J.; VRANA, K. E. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. **Biotechniques**, v. 29, p. 1042, 2000.

FUMIS, T. F. & PEDRAS, J. F. Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 449-453, 2002.

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.

GIBSON, S. I. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Plant Biology**, v. 8, p. 93–102, 2005.

GRIVET, L.; GLASZMANN, J. C.; ARRUDA, P. Sequence polymorphism from EST data in sugarcane: A fine analysis of 6-phosphogluconate dehydrogenase genes. **Genet. Mol. Biol**, v. 24, p. 161–167, 2001.

HARE, P. D. & CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79-102, 1997.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; STADEN, J. V. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 21, p. 535-53, 1998.

HAUSE, B.; HAUSE, G.; KUTTER, C.; MIERSCH, O.; WASTERACK, C. Enzymes of Jasmonate Biosynthesis Occur in Tomato Sieve Elements. **Plant Cell Physiol**, v. 44(6), p. 643–648, 2003.

HSIAO, T.C. Plant responses to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 24, p. 519-570, 1973.

HU, C. A. A.; LIN, W. W.; VALLE, D. Cloning, characterization and expression of cDNAs encoding human D1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 9795-9800, 1996.

HUANG, X. & MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res**, v. 9, p. 868–877, 1999.

HUBER, S. C. & HUBER, J. L. Role And Regulation Of Sucrose-Phosphate Synthase In Higher Plants. **Plant Mol. Biol**, v. 4, p. 431–441, 1996.

HUBER, W.; von HEYDEBRECK, A.; SÜLTMANN, H.; POUSTKA, A.; VINGRON, M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to quantification of differential expression. **Bioinformatics**, v. 18, p. 96-104, 2002.

INDRA DEWI, R. & SUGIHARTO, S. B. Effect of drought stress on carbohydrate metabolism and nitrogen assimilation in sugarcane plant. In. **2nd Indonesian Biotechnology Conference**, Yogyakarta, 2001, p. 23.

KISHOR, P. B. K.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R., RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **CURRENT SCIENCE**, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.

KOSMAS, S. A.; ARGYROKASTRITIS, A.; LOUKAS, M. G.; ELIOPOULOS, E.; TSAKAS, S.; KALTSIKES, P. J. Isolation and characterization of stress related Heat shock protein calmodulin binding gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Planta**, v. 223, p. 329-339, 2006.

KRAMELL, E.; ATZORN, R.; SCHNEIDER, G.; MIERSCH, O.; BRUCKNER, C.; SCHMIDT, J.; SEMBDNER, G.; PARTHIER, B. Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino-acid conjugates induced by osmotic-stress in barley leaf tissue. **Journal of plant Growth Regulation**, v. 14, p. 29-36, 1995.

KRAMER, P. J. & BOYER, J. S. Water relations of plants and soils. San Diego, **Academic Press**, 1995. 495p.

KRIEGER-LISZKAY, A. Singlet oxygen production in photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 411, p. 337–346, 2004.

KOTCHONI, S. O. & BARTELS, D. Water stress induces the up-regulation of a specific set of genes in plants: aldehyde dehydrogenases as an example. **BULG. J. PLANT PHYSIOL**, special issue, 2003, p. 37–51.

KUNKEL, B. N. & BROOKS, D. M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opin Plant Biology**, v. 5, p. 325-332, 2002.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000, 531 p.

LARCHER, W. A Planta sob Estresse. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa Artes e Textos, p. 341-478, 2004.

LAWLOR, D. W. Limitation of photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, v. 89, p. 871-885, 2002.



LEON, J.; ROJO, E.; SANCHEZ-SERRANO, J. J. Wound signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1-9, 2001.

MCNEIL, S. D.; NUCCIO, M. L.; HANSON, A. D. Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. **Plant Physiology**, v. 120, p. 945-949, 1999.

MENESES, C. H. S. G.; LIMA, L. H. G. M.; LIMA, M. M. A.; VIDAL, M. S. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. **Rev. Bras. ol. Fibrós.**, v. 10, n. 1/2, p. 1039-1072, 2006.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; BESPALHOK J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PILEGGI, M.; PEREIRA, F. P. P.; VIEIRA, L. G. E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v. 167, p. 1375-1381, 2004.

MOLINARI, H. B. C. **Expressão estresse-induzida do gene *p5cs* em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico.** 2006. 124f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006.

MOORE, P. H. Temporal and spatial regulation of sucrose accumulation in the sugarcane stem. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 22, p. 661-679, 1995.

MUNNÉ-BOSCH, S.; JUBANY-MARÍ, T.; ALEGRE, L. Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, n. 12, p. 1319-1327(9), 2001.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica.** 3.ed. São Paulo: SARVIER, 2002, 975p.

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 23, p. 12-18, 2001.

NODA, R. W. **Etiquetas de seqüências expressas (ests) relacionadas ao estresse hídrico na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar**. 2003. 76f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

OBER, E. S. & LUTERBACHER, M. C. Genotypic variation for drought tolerance in *Beta vulgaris*. **Annals of Botany**, v. 89, p. 917-924, 2002.

ODA, A.; SHIMIZUA, M.; KUROHA, T.; SATOH, S. Induction of xylem sap methylglycine by a drought and rewatering treatment and its inhibitory effects on the growth and development of plant organs. **Physiologia Plantarum**, v. 124, p. 515–523, 2005.

PARCHMANN, S.; GUNDLACH, H.; MUELLER, M. J. Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. **Plant physiology**, v. 115, p. 1057-1064, 1997.

PASSOS, G. A. S.; NGUYEN, C.; JORDAN, B. Projeto Transcriptoma, Análise da expressão gênica em larga escala usando DNA-arrays. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 12, p. 34-37, 1999.

PHANG, J. M. The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. **Current Topics in Cell Regulation**, v. 25, p. 91-132, 1985.

PELAH, D.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A.; BARTELS, D. Water-stress response in aspen (*Populus tremula*): differential accumulation of dehydrin, sucrose synthase, GAPDH homologues, and soluble sugars. **J. Plant Physiol**, v. 151, p. 96–100, 1997.

PIMENTEL, C. & HÉBERT, G. Potencial fotossintético e condutância estomática em espécies de feijão caupi sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11(1), p. 7-11, 1999.

QUIANG, L.; NANMING, Z.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. **Chinese Science Bulletin**, v. 45, n. 11, p. 970-975, 2000.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1189-1202, 2004.

RHODES, D. & HANSON, A. D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 357-384, 1993.

ROMERO, C.; BELLES, J. M.; VAYÁ, J. L.; SERRANO, R. CULIÁNEZ-MACIÀ, F. A. Expression of the yeast *trehalose-6-phosphate synthase* gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. **Planta**, v. 201, p. 293-297, 1997.

RONTEIN, D.; BASSET, G.; HANSON, A. D. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. **Metabolic Engineering**, v. 4, p. 49-56, 2002.

SACILOTO, R. F. Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***, 2003. 74f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning; a laboratory manual**. 2<sup>o</sup> ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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

SCHENA, M. SHALON, D. DAVIS, R. W. BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270, p. 467-470, 1995.

SCHENA, M.; HELLER, R. A.; THERIAULT, T. P.; KONRAD, K.; LACHENMEIER, E.; DAVIS, R. W. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. **Elsevier Science**, v. 16, p. 301-306, 1998.

SCHLUEPMANN, H.; VAN DIJKEN, A.; AGHDASI, M.; WOBES, B.; PAUL, M.; SMEEKENS, S. Trehalose Mediated Growth Inhibition of Arabidopsis Seedlings Is Due to Trehalose-6-Phosphate Accumulation. **Plant Physiology**, v. 135, p. 879–890, 2004.

SCHUMMER, M.; WAILAP, V. N. G.; BUMGARNER, R. E.; NELSON, P. S.; SCHUMMER, B.; BEDNARSKI, D. W.; HASSELL, L.; BALDWIN, R. L.; KARLAN, B. Y.; HOOD, L. Comparative hybridization of an array of 21500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. **Gene**, Napoli, v. 238, p. 375-385, 1999.

SEKI, M.; KAMEI, A.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Current Opinion of Biotechnology** v. 14, p.194-199, 2003.

SERRAJ, R. & SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant and Cell Environment**, v. 25, p. 333-341, 2002.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: difference and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 217-223, 2000.

SOUZA, G. M. & DA SILVA, A. M. SUCAST: Desvendando as vias de transdução de sinal da cana-de-açúcar. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 25, p. 58-63, 2002.

SUCEST. Disponível em

[http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/cgi-bin/prod/blast/form\\_maker.pl](http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/cgi-bin/prod/blast/form_maker.pl). Acesso: 14/05/2007.

SUGIHARTO, B.; SUHASTUTI, S.; SAKAKIBARA, H. Expression of sugarcane sucrose-phosphatesynthase iso-enzymes in *Escherichia coli* and their characterizations. In. **2nd Indonesian Biotechnology Conference**, Yogyakarta, 2001, p.7.

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. **Fisiologia Vegetal**. 3<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: ARTMED Editora S.A., 2004.

TAYLOR, C. B. Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1221-1224, 1996.

TELLES, G. P.; BRAGA, M. D. V.; DIAS, Z.; LIN, T. L.; QUITZAU, J. A. A.; DA SILVA, F. R.; MEIDANIS, J. Bioinformatics of the Sugarcane EST Project. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, nº 1-4, p. 9-15, 2001.

TURNER, J. G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The Jasmonate Signal Pathway. **The Plant Cell**, p. 153–164, 2002.

UNICA. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br/portalunica/>. Acesso 23/05/2007.

VETTORE, A., KEMPER, E., DA SILVA, F.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 1-7, 2001.

WARREN, C. R. & DREYER, E. Temperature response of photosynthesis and internal conductance to CO<sub>2</sub>: results from two independent approaches. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 12, p. 3057–3067, 2006.

WASTERNAK, C. & HAUSE, B. Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress responses and plant development. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol*, v. 72, p. 165–221, 2002.

WILLADINO, L. & CAMARA, T. R. Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. In: Eds. NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**, p. 118-126, 2005.

WOOD, A. J.; SANEOKA, H.; RHODES, D.; JOLY, R. J.; GOLDSBROUGH, P. B. Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. Molecular cloning and expression of two related genes. **Plant Physiology**, v. 110, p. 1301-1308, 1996.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K & SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science** v. 10, p. 88-94, 2005.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. **Photosynthetica**, v. 38 (1), p. 171-186, 2000.

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

XIONG, L. & ZHU, J. K. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. **Physiol Plant**, v. 112, p. 152–166, 2001.

ZIEGLER, J.; STENZEL, I.; HAUSE, B.; MAUCHER, H.; HAMBERG, M.; GRIMM, R.; GANAL, M.; WASTERACK, C. Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 275(25), p. 19132-19138, 2000.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.