



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Taciana Conceição Manso

**Expressão de genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar
(*Saccharum* spp.) em resposta à seca**

Recife

2014

Taciana Conceição Manso

**Expressão de genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar
(*Saccharum* spp.) em resposta à seca**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior

**Recife
2014**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Manso, Taciana Conceição

Expressão de genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) em reposta à seca/ Taciana Conceição Manso. – Recife: O Autor, 2014.

95 folhas: il.

Orientador: Tercilio Calsa Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Genética, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Regulação de expressão gênica
 2. Cana-de-açúcar
- I. Calsa, Júnior, Tercilio (orient.) II. Título.

572.865

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-127

Taciana Conceição Manso

**Expressão de genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar
(*Saccharum* spp.) em resposta à seca**

Aprovada em 06/05/2014

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Benko-Iseppon
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Adriana Vieira Gomes
Universidade de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Andrea Pedrosa Harand
Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2014

À minha mãe Rosalba Maria da Conceição.

À minha filha querida Mariana Conceição França.

Ao meu eterno companheiro Allan Luis Ramos de
França (*in memoriam*).

Pelo amor, carinho e apoio incondicional em todos
os momentos de minha vida.

Dedico.

Agradecimentos

Ao meu orientador Tercilio Calsa Junior, por acreditar na minha capacidade em realizar este trabalho, pela orientação, paciência e respeito que adquirimos ao longo de mais uma jornada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo.

À Rede de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento em Bioetanol do Estado de Pernambuco/FACEPE pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Aos colaboradores da UNICAMP, Prof. Marcelo Menossi e Agustina Gentile, UFRPE, Prof^a Dr^a Rejane Mansur, Marcelle Almeida e Cinthya Pacheco, pela realização do experimento em casa-de-vegetação e análises fisiológicas.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular CEONHPE/UPE, em especial a Adriana Vieira e Nara Diniz, pela oportunidade de utilizar suas instalações no desenvolvimento deste trabalho e pela experiência trocada. Foi muito bom conviver com vocês.

Aos meus amigos do LGPP, Renata Almeida, Cinthya, Regina, Amanda, Celuzinha, Adauto, Romel, Paulo, Marciana, Raul, Nielton e Juliana, por todo o apoio que me deram e pelos momentos alegres no laboratório.

À minhas amigas, Renata Oliveira e Maria Francyllen, por todo o carinho mesmo estando longe.

À minha família, minha mãe, Rosalba, e ao meu marido, Allan (*in memoriam*), por toda paciência e apoio que recebi durante esse momento tão importante em minha carreira acadêmica.

À minha filha, Mariana, pela maravilhosa oportunidade de ser mãe e doaprendizado mútuo a cada dia.

Acima de tudo agradeço a Deus, pelo dom da vida, por minha família e por mais esta graça concedida.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, que aqui não foram citados, os meus sinceros agradecimentos.

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

Charles Darwin

Resumo

A cana-de-açúcar é uma gramínea com grande capacidade de acumular sacarose em seu colmo, a qual é purificada para produção de açúcar, etanol e biodiesel. As plantas são capazes de perceber alterações ambientais e modificar o perfil de expressão gênica, ativando mecanismos de defesa, incluindo a regulação da fotossíntese nos cloroplastos. Assim, o conhecimento do perfil de expressão do genoma cloroplastidial viabiliza a identificação dos genes que regulam a resposta a estresses abióticos. Através de busca *in silico* por transcritos cloroplastidiais em banco de ESTs de cana-de-açúcar, foram identificados 12 genes com expressão em bibliotecas de folha em diferentes estágios de desenvolvimento, utilizados para desenho de primers específicos. O RNA total foi extraído a partir de folhas +1 de cana-de-açúcar das variedades RB92579 (tolerante) e RB72454 (sensível) submetidas a estresse por déficit hídrico. Após transcrição reversa, a qPCR foi conduzida no sistema Rotor-Gene 6000 e a validação dos dados foi realizada no programa REST 2009. A análise *in silico* mostrou uma prevalência dos genes cloroplastidiais em bibliotecas de folhas. As análises de expressão gênica apontam a perfis de expressão diferenciados nas variedades analisadas. O aumento nos níveis dos transcritos codificantes para componentes dos fotossistemas parece auxiliar a cana-de-açúcar na tolerância à seca, pela reposição e/ou aumento do número de fotossistemas na membrana do tilacóide. Enquanto que a repressão do gene *petA* (citocromo b_6f) pode favorecer a redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O gene *rbcL* apresentou uma indução na variedade tolerante em comparação com a sensível, podendo estar relacionado com a alta produtividade atribuída a essa variedade. Assim, indicamos os genes cloroplastidiais *psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbD* e *petA* os mais relacionados à tolerância à seca, podendo ser fortes candidatos a marcadores moleculares cloroplastidiais de tolerância à seca, visando auxiliar programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: cloroplasto; estresse abiótico; PCR quantitativa; marcador molecular

Abstract

Sugar cane is a grass with great capacity to accumulate sucrose in the stems, which is extracted to produce sugar, ethanol and biodiesel. Plants can perceive environmental changes and modify their gene expression profile by activating defense mechanisms, including the regulation of photosynthesis in chloroplasts. Thus, knowledge of the expression profile of the chloroplast genome allows the identification of genes that regulate plant responses to abiotic stresses. Through *in silico* search for chloroplast transcripts in ESTs database of sugarcane, 12 genes were identified with expression in leaf libraries under different stages of development for which specific primers were designed. Total RNA was extracted from sugarcane +1 leaves from RB92579 (tolerant) and RB72454 (sensitive) varieties subjected to water deficit stress. After reverse transcription, qPCR was performed on Rotor-Gene 6000 system and data validation was performed on REST 2009. *In silico* analysis showed a prevalence of genes in leaf libraries. Analyses of gene expression indicated the difference in expression profiles in analyzed varieties. The increased levels of coding transcripts for components of photosystems seems to help sugarcane to cope with drought tolerance, due to the replacement and/or increase in the number of photosystem subunits in the thylakoid membrane. The *petA* gene repression (cytochrome b6f) may reduce the production of reactive oxygen species (ROS). *rbcL* gene presented an induction in tolerant variety compared with the sensitive and may be related to higher productivity in this variety. Thus, the chloroplast genes *psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbD* and *petA* are suggested to be related to drought tolerance response, becoming strong candidates for chloroplast molecular markers in drought tolerance, aiming to help genetic breeding programs of sugarcane.

Key words: chloroplast; abiotic stress; quantitative PCR; molecular markers

Lista de Ilustrações

- Figura 1.** Representação gráfica dos nove maiores países produtores de cana-de-açúcar no ano de 2012 de acordo com a FAOSTAT. O Brasil se encontra como o maior produtor, seguido por Índia e China6
- Figura 2.** Mapa da produção agrícola de cana-de-açúcar no Brasil7
- Figura 3.** Representação das áreas com plantio favorável de cana-de-açúcar numa projeção para o ano de 2050 com base num cenário pessimista do aquecimento global.....9
- Figura 4.** Mecanismos de percepção e respostas das plantas frente a estresses abióticos. Após o reconhecimento de alterações no meio, o sinal é transduzido no interior das células da planta até desencadear alterações fisiológicas para adaptação ao estresse..... 10
- Figura 5.** Transporte vetorial de prótons e elétrons nas membranas do tilacóide do cloroplasto através dos fotossistemas II e I, culminando na redução de NADP^+ em NADPH e na síntese de ATP 13
- Figura 6.** Esquema geral da fotossíntese 16
- Figura 7.** Modelo do mapa do genoma cloroplastidial de cana-de-açúcar. Os genes localizados fora do círculo são transcritos no sentido horário, enquanto aqueles localizados dentro do círculo são transcritos no sentido anti-horário. Os genes estão agrupados por cor de acordo com sua categoria metabólica: metabolismo geral vermelho, transcrição e aparelhos de tradução azul escuro, ORFs cinza claro, complexo NADH desidrogenase amarelo, citocromo complexo b6f laranja,

fotossistemas I e II verde, complexo ATP sintase marrom, subunidade grande da RuBisCO verde escuro. Os genes em cinza escuro com asteriscos indicam presença de *introns* (Calsa Jr *et al.*, 2004). Os genes marcados em quadrados vermelhos foram analisados neste estudo por RT-qPCR, *psbH*, *psbN*, *petA*, *rbcL*, *ndhC*, *ndhJ*, *psaA*, *psaB*, *atpH*, *psbD*, *psbK* e *psbA*. IR regiões repetidas invertidas, SSC região pequena de cópia única e LSC região longa de cópia única..... 18

Figura 8. Representação gráfica das fases da PCR quantitativa, relacionando o número de ciclos com o aumento da quantidade do sinal fluorescente e do produto23

Figura 9. Exemplificação das fórmulas de cálculo para expressão gênica por PCR em Tempo Real, descritas pelo método $\Delta\Delta C_q$ (VanGuilder *et al.*, 2008) (A) e pelo método do programa REST (Pfaffl *et al.*, 2002) (B).....25

Figura 10. Experimento montado em casa-de-vegetação (Laboratório de Fisiologia Vegetal/UFRPE) 90 dias após transplântio e aclimação, antes do início dos tratamentos.29

Figura 11. (A) Prevalência dos órgãos vegetais observados em bibliotecas de cDNA correspondentes a genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar disponível no banco de dados TIGR Gene Index de cana-de-açúcar. (B) Distribuição *in silico* das famílias gênicas identificadas no banco de dados TIGR Gene Index, sendo fotossistema I (*psa*), fotossistema II (*psb*), citocromo b_6f (*pet*), NADH desidrogenase (*ndh*) e ATP sintase (*atp*).....42

Figura 12. Valores médios do potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}) nas variedades de cana-de-açúcar tolerante e sensível à seca, cultivadas em casa-de-vegetação sob déficit hídrico por oito dias, com medidas ao meio-dia (12 h). * Comparação entre

tratamentos (controle e seca). + Comparação entre variedades. ** diferença significativa ao nível de 5% pelo teste *Tukey*. ++ diferença significativa ao nível de 5% pelo teste *Tukey*. CV% = -5,19, DMS para colunas=0,2556 e DMS para linhas=0,2556.....47

Figura 13. Valores médios da fotossíntese líquida (A) nas variedades de cana-de-açúcar tolerante e sensível à seca, cultivadas em casa-de-vegetação sob déficit hídrico por oito dias. Letras minúsculas comparam diferentes tratamentos dentro de uma mesma variedade. Letras maiúsculas comparam o mesmo tratamento entre variedades. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade. CV% = 12,41, DMS para colunas=3,1251 e DMS para linhas=3,1251.....48

Figura 14. Valores médios da transpiração foliar (E) nas variedades de cana-de-açúcar tolerante e sensível à seca, cultivadas em casa-de-vegetação sob déficit hídrico por oito dias. Letras minúsculas comparam diferentes tratamentos dentro de uma mesma variedade. Letras maiúsculas comparam o mesmo tratamento entre variedades. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade. CV% = 27,32, DMS para colunas= 1,7805 e DMS para linhas= 1,7805.49

Figura 15. Valores médios da concentração interna de CO₂ (Ci) nas variedades de cana-de-açúcar tolerante e sensível à seca, cultivadas em casa-de-vegetação sob déficit hídrico por oito dias. Letras minúsculas comparam diferentes tratamentos dentro de uma mesma variedade. Letras maiúsculas comparam o mesmo tratamento entre variedades. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade. CV% = 58,29, DMS para colunas= 88,43574 e DMS para linhas= 88,43574.....50

Figura 16. Gel de agarose 1% com o RNA total extraído. Utilizou-se o marcador de DNA 1 kb.....	51
Figura 17. Gel de agarose 1% com o produto da PCR convencional do teste dos <i>primers</i> de cloroplasto de cana-de-açúcar, utilizando DNA genômico e extra nuclear como molde. Controle negativo (C-), marcador de DNA 25 pb e 1 Kb.....	52
Figura 18. Gel de agarose 1% com o produto da PCR convencional do teste dos <i>primers</i> de cloroplasto de cana-de-açúcar, utilizando pool de cDNA como molde. Controle positivo DNA (C+), controle negativo (C-), marcador de DNA 100 pb.	53
Figura 19. Gel de agarose 1% com o produto da PCR convencional do teste dos <i>primers</i> de cloroplasto de cana-de-açúcar, utilizando cDNA de cada tratamento como molde (Controle e Seca). Controle positivo DNA (C+), controle negativo (C-), marcador de DNA 100 pb. 579 (variedade tolerante), 454(variedade sensível), réplicas biológicas de cada tratamento (P1, P2 e P3).....	54
Figura 20. (A) Gráfico de amplificação do gene <i>psaA</i> obtido no Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) comparando as diferentes concentrações no ensaio de otimização dos <i>primers</i> de cloroplasto de cana-de-açúcar. (B) Curva de dissociação (<i>melting</i>) obtida a partir da amplificação do gene <i>psaA</i> de cana-de-açúcar na concentração de 0,5 μ M, mostrando apenas um pico de dissociação (aproximadamente 80°C), confirmando a amplificação específica do alvo.	55
Figura 21. Curva padrão de amplificação do gene <i>psbK</i>	56
Figura 22. Gráfico obtido no programa geNorm relacionando a estabilidade gênica de cada gene analisado, com valor de estabilidade $M < 1,5$. É possível distinguir os genes mais estáveis (<i>rpl35-4/UbiQ2</i>) dos genes menos estáveis (<i>Tubulina</i> e <i>Actina</i>).	59

Figura 23. Representação gráfica da expressão relativa de genes cloroplastidiais da variedade tolerante(A) e sensível (B) de cana-de-açúcar em relação aos genes de referência *UbiQ2* e *rp135-4*, submetida à seca por oito dias. As barras representam 50% dos valores observados; a linha tracejada representa a mediana das amostras; os limites extremos representam 25% das amostras superiores ($\top$) e 25% das amostras inferiores ($\perp$). * mostram valores de expressão com diferenças significativas a $p<0,05$ pelo teste de hipóteses P (H1) REST 2009.62

Figura 24. Representação gráfica da expressão relativa de genes cloroplastidiais da variedade tolerante de cana-de-açúcar comparando com a variedade sensível de cana-de-açúcar em relação aos genes de referência *UbiQ2* e *rp135-4*, submetida à seca por oito dias. As barras representam 50% dos valores observados; a linha tracejada representa a mediana das amostras; os limites extremos representam 25% das amostras superiores ($\top$) e 25% das amostras inferiores ($\perp$). * mostram valores de expressão com diferenças significativas a $p<0,05$ pelo teste de hipóteses P (H1) REST 2009.....66

Figura 25.Modelo esquemático do mecanismo de resposta cloroplastidial das variedades tolerante (A)e sensível (B) à seca de cana-de-açúcar submetidas a estresse por seca, evidenciando as subunidades proteicas codificadas por genes induzidos (em verde) e inibidos (em vermelho), os complexos proteicos em cinza não foram avaliados ou não apresentaram expressão diferenciada. Figura editada a partir do mapa de vias metabólicas do KEGG (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00195&show_description=show). Complexo NADH Desidrogenase inserido a partir do modelo proposto por Martín e Sabater (2010)...80

Figura 26.Modelo esquemático do mecanismo de resposta cloroplastidial comparando as variedades sensível e tolerante à seca de cana-de-açúcar

submetidas a estresse por seca, evidenciando as subunidades proteicas codificadas por genes induzidos (em verde) e inibidos (em vermelho), os complexos proteicos em cinza não foram avaliados ou não apresentaram expressão diferenciada. Figura editada a partir do mapa de vias metabólicas do KEGG (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00195&show_description=show). Complexo NADH Desidrogenase inserido a partir do modelo proposto por Martín e Sabater (2010)...81

Lista de Tabelas

Tabela 1. Genes de referência de cana-de-açúcar para teste de estabilidade na qPCR. Sequência dos <i>primers</i> , número de acesso (TC n°) e tamanho do <i>amplicon</i> (pb). O TC n° corresponde ao número de identificação da sequência (<i>tentative consensus</i>) no banco de dados de ESTs de cana-de-açúcar (TIGR Gene Index)....	38
Tabela 2. Transcritos codificados por genes cloroplastidiais encontrados no banco de dados TIGR Gene Index por meio de BLASTn. São mostrados dados referentes ao tamanho do TC, a identificação no banco TIGR Gene Index, o gene correspondente, à similaridade (Sim) do alinhamento obtido, prevalência dos TC's nas bibliotecas, bibliotecas de origem e o órgão utilizado para construção da biblioteca.	43
Tabela 3. <i>Primers</i> desenhados pelo programa Primer3 a partir de genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar. Posição do pareamento na sequência; sequência do <i>primer forward</i> e <i>reverse</i> , respectivamente; tamanho do <i>amplicon</i> ; temperatura de anelamento (TM); possíveis interações entre os <i>primers</i> (NetPrimer).	45
Tabela 4. Quantificação de RNA total de folhas de cana-de-açúcar das variedades tolerante e sensível à seca sob diferentes regimes hídricos, controle eseca por oito dias.....	52
Tabela 5. Eficiências de amplificação, <i>slope</i> (M) e R^2 apresentados pelos <i>primers</i>	57
Tabela 6. Valores de estabilidade (Sv) determinados pelo programa NormFinder para os candidatos a genes de referência testados.	58
Tabela 7. Expressão relativa de genes cloroplastidiais de diferentes variedades de cana-de-açúcar submetidas à seca comparando com seus respectivos controles não	

tratados, em relação aos genes de referência *rpl35-4* e *UbiQ2*. Dados obtidos no programa REST 2009.61

Tabela 8. Expressão relativa de genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar submetidas à seca comparando as variedades sensível e tolerante, em relação aos genes de referência *rpl35-4* e *UbiQ2*. Dados obtidos no programa REST 2009.....65

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
A	Taxa de fotossíntese
ABA	Ácido abscísico
<i>atp</i>	Família gênica codificante do complexo ATP sintase
ATP	Trifosfato de adenosina
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (alinhamento local de sequências de nucleotídeos)
cDNA	DNA complementar ao RNA
Ci	Concentração de CO ₂ intracelular
CIB	Conselho de Informações sobre Biotecnologia
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
cpDNA	DNA cloroplastidial
Cq	Ciclo de quantificação
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DTT	Ditiotreitol
E	Transpiração
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EECAC	Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina
Eff	Eficiência de amplificação da qPCR
EP	Erro padrão

EST	<i>Expressed Sequence Tag</i> (Região de sequência expressa)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAOSTAT	Divisão Estatística da FAO
G3P	Triose fosfato
GC%	Porcentagem de bases nitrogenadas guanina e citosina
IR	<i>Inverted Repeat Region</i> (Região Repetida Invertida)
Kb	Kilo bases
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LSC	<i>Large Single Copy</i> (Região de Cópia Única Longa)
M	<i>Expression Stability</i> (Estabilidade da expressão)
MT	Milhões de tonelada
NADPH	Fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>ndh</i>	Família gênica codificante do complexo NADH desidrogenase
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
<i>pet</i>	Família gênica codificante do complexo citocromo b ₆ f
<i>psa</i>	Família gênica codificante do complexo fotossistema I
<i>psb</i>	Família gênica codificante do complexo fotossistema II
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
qPCR	PCR quantitativa
R ²	Coeficiente de correlação de Pearson
<i>rbcL</i>	<i>RuBisCO large subunit</i> (gene codificante da subunidade grande da RuBisCO)

RIDESA	Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
rRNA	RNA ribossomal
RT-qPCR	PCR quantitativa com transcrição reversa
RubisCO	Ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase
SAGE	<i>Serial Analysis for Gene Expression</i> (Análise Serial da Expressão Gênica)
Sim	Similaridade do alinhamento
SoGI	Banco de dados do TIGR Gene Index de <i>Saccharum officinarum</i>
SUCEST	<i>Sugarcane EST</i> (EST de cana-de-açúcar)
Sv	<i>Stability value</i> (valor de estabilidade)
SSC	<i>Small Single Copy</i> (Região de Cópia Única Curta)
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TC	Tentative consensus
TM	Temperatura de <i>Melting</i> (dissociação)
tRNA	RNA transportador
UNICA	União da Indústria de Cana-De-Açúcar
V	Coeficiente de variação
VE	Valor de Expressão Relativa
vs.	<i>versus</i>
<i>ycf</i>	<i>Hypothetical chloroplast frames</i> (sequências hipotéticas cloroplastidiais conservadas)
ΔG	Energia livre de Gibbs
Ψ_{w_f}	Potencial hídrico foliar

Sumário

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Ilustrações	ix
Lista de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	xvii
1. Introdução informação sobre a cana e a cultura no NE	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 CANA-DE-AÇÚCAR (<i>Saccharum</i> spp.)	3
2.1.1 Importância econômica	4
2.1.2 Cana-de-açúcar no Brasil	6
2.2 ESTRESSES ABIÓTICOS	10
2.2.1 Déficit hídrico	11
2.3 CLOROPLASTOS – MAQUINARIA FOTOSSINTÉTICA	15
2.3.1 Genoma cloroplastidial de cana-de-açúcar	17
2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO	20
2.5 TÉCNICAS DE ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	21
2.5.1 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	22
3. Objetivos	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. Material e Métodos	28
4.1 ANÁLISES IN SILICO	28
4.2 MATERIAL VEGETAL	29
4.2.1 Parâmetros fisiológicos	31
4.3 ANÁLISE DO PERFIL GÊNICO	32
4.3.1 Extração e Quantificação de RNA	32
4.3.2 Tratamento com DNase I e Síntese de cDNA	34
4.3.3 Amplificação do DNA e cDNA por PCR convencional	35
4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR	36
4.4.1 Normalização e Eficiência da qPCR	37
4.4.2 Delineamento experimental	38
5. Resultados	41
5.1 PREVALÊNCIA DE ESTs CLOROPLASTIDIAIS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA CANA-DE-AÇÚCAR	41
5.1.1 Desenho de <i>primers</i>	44
5.2 ANÁLISE DO MATERIAL VEGETAL	47
5.2.1 Perfis fisiológicos do material vegetal	47
5.2.1.1 Potencial hídrico foliar (Ψ_{wf})	47

5.2.1.2 Fotossíntese líquida (A), transpiração foliar (E) e concentração interna de CO ₂ (Ci).....	48
5.2.2 Extração de RNA total.....	51
5.2.3 Teste dos <i>primers</i> e síntese de cDNA.....	52
5.3 ENSAIO DE qPCR.....	54
5.3.1 Otimização dos <i>primers</i>	54
5.6.2 Eficiência de amplificação	55
5.6.3 Validação dos genes de referência	58
5.4 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA POR RT-qPCR.....	60
5.4.1 Comparação tolerante/sensível vs. respectivos controles.....	60
5.4.2 Comparação variedade sensível vs. variedade tolerante.....	64
6. Discussão	68
6.1 IDENTIFICAÇÃO DE ESTs CLOROPLASTIDIAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR...	68
6.2 MATERIAL VEGETAL	69
6.2.1 Análises Fisiológicas	69
6.3 EXPRESSÃO RELATIVA POR RT-qPCR	69
6.3.1 Genes de referência de cana-de-açúcar	69
6.3.2 Expressão relativa: tolerante/sensível vs. controles não estressados.....	70
6.3.2.1 Fotossistemas I e II	70
6.3.2.2 Complexo citocromo b ₆ f	73
6.3.2.3 Complexo NADH desidrogenase.....	73
6.3.2.4 Complexo ATP sintase.....	75
6.3.2.5 Subunidade maior da RuBisCO (<i>rbcL</i>)	76
6.3.3 Expressão relativa: sensível vs. tolerante	77
6.3.4 Modelos esquemáticos da resposta cloroplastidial à seca.....	78
7. Conclusões	83
8. Bibliografia.....	84
9. Curriculum vitae (<i>Lattes</i>)	93

1. Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, apresentando posição de destaque dessa cultura na agricultura brasileira. A cana-de-açúcar é bastante explorada por apresentar grande capacidade de acumular sacarose em seu colmo entre as plantas C4, a qual é purificada para produção de açúcar, etanol e biodiesel, principalmente. A partir da década de 1970, o Brasil ganhou destaque na produção de etanol combustível, estabelecendo o setor sucroalcooleiro na matriz energética do país e tornando a cana-de-açúcar uma importante matéria prima. A produção de cana-de-açúcar e açúcar no Brasil apresenta altos índices de produtividade e competitividade, mas a região Norte-Nordeste ainda apresenta índices de competitividade menores que a Centro-Sul, razão por que necessita de constantes intervenções governamentais.

As condições ambientais no País têm causado grandes perdas nas lavouras de cana-de-açúcar, causando prejuízos econômicos, principalmente na região Nordeste, como a escassez de chuvas ocorrida em 2010 e 2011, situação que vem se repetindo nos últimos anos. A seca afeta a produtividade das lavouras de cana-de-açúcar, obrigando os produtores a investir na formação de novos canaviais para recuperar as áreas afetadas pelo clima, aumentando os custos da lavoura.

Diariamente, as plantas são frequentemente expostas a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos, tais como a seca, a salinidade do solo e as baixas ou altas temperaturas são consideradas os fatores mais limitantes da produção vegetal, ocasionando grandes perdas de produtividade de culturas economicamente importantes. A percepção dessas diferentes condições de estresse leva a alterações no perfil de expressão gênica e a ativação de respostas bioquímicas e fisiológicas

nas plantas, de forma a propiciar a sobrevivência da mesma frente às condições adversas.

Durante a percepção do estresse por déficit hídrico, ocorre a diminuição da taxa fotossintética nos cloroplastos, devido à baixa assimilação de dióxido de carbono (CO_2), decorrente do fechamento estomático, além da grande deposição de cutícula nas folhas; afetando a produção de açúcar pela planta. Essa percepção acarreta na alteração da expressão gênica, desencadeando em alterações fisiológicas para adaptação ao estresse. Dessa forma, os genes cloroplastidiais também são induzidos ou inibidos durante a percepção do estresse.

O déficit hídrico é um dos fatores abióticos mais limitantes do crescimento vegetal, sendo necessário investir em estratégias dispendiosas de irrigação da cultura. Desta forma, estratégias de melhoramento genético vegetal visam o aumento da eficiência e da produtividade de culturas através de novas variedades de plantas adaptáveis às condições de cada região.

Uma melhor compreensão dos genes cloroplastidiais envolvidos nas respostas ao déficit hídrico é necessária para caracterizar os mecanismos que permitem a adaptação em condição limitante de água. Porém, a falta de estudos relacionados diretamente com o perfil de expressão de genes cloroplastidiais sob estresses abióticos dificulta a compreensão dos possíveis mecanismos que a planta utiliza para tolerar o estresse sofrido.

Desta forma, este trabalho objetivou avaliar o perfil de expressão de genes cloroplastidiais em variedades de cana-de-açúcar contrastantes para tolerância ao déficit hídrico, de modo a traçar um modelo presumível de ativação ou inibição desses genes.

2. Revisão da Literatura

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene em sua forma natural, porém, semiperene no cultivo extensivo (CIB, 2009); tem como origem o Sudeste asiático (Daniels e Roach, 1987), apresentando facilidade de adaptação às condições climáticas do Brasil (Alfonsi *et al.*, 1987).

As canas cultivadas comercialmente são principalmente híbridos de diferentes espécies do gênero *Saccharum*, que é agrupado na subtribo Saccharinae, tribo Andropogoneae, se distinguindo por ser característica de clima tropical e subtropical (Amalraje Balasundaram, 2006). As variedades comerciais de cana-de-açúcar se originaram de cruzamentos realizados entre variedades da espécie *S. officinarum* – rica em açúcar, mas suscetível a doenças – com variedades de *S. spontaneum*, que é pobre em açúcar, porém resistente aos problemas do campo. Os híbridos obtidos apresentaram maior resistência a pragas, doenças e deficiência hídrica, por exemplo; além de possuírem alto teor de sacarose (CIB, 2009).

A cana-de-açúcar apresenta alta capacidade de fixação de CO₂, mesmo em baixas concentrações, por se tratar de uma planta com fotossíntese C4 (Magro *et al.*, 2011), aumentando a produção de sacarose pela planta. Essa característica levou à grande exploração econômica da cana-de-açúcar desde o período colonial, para produção de açúcar (Carvalho *et al.*, 2013). A partir da década de 1970, a cana-de-açúcar ganhou destaque na produção de etanol combustível, estabelecendo o setor

sucroalcooleiro na matriz energética do país, que tornou a cana-de-açúcar uma importante matéria prima (Carvalho *et al.*, 2013).

2.1.1 Importância econômica

A cana-de-açúcar é bastante explorada para extração de sacarose uma vez que apresenta grande capacidade de acumular açúcar em seu colmo quando comparada a outras plantas C4, a qual é purificada para o consumo humano e de animais, além de ser utilizada, industrialmente, para produção de açúcar, etanol e biodiesel (Azevedo *et al.*, 2011).

O Programa Nacional do Álcool (ProÁlcool), lançado pelo governo brasileiro em 1975, visou estimular a produção de álcool anidro para mistura à gasolina como estratégia para reduzir o consumo desta (Rodrigues L, 2010). A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar por via fermentativa estimulou o crescimento do setor sucroalcooleiro (NovaCana, 2013). O país é o segundo maior exportador de etanol do mundo, perdendo apenas para a produção de etanol pelos Estados Unidos a partir do milho (Rached, 2011).

A busca por combustíveis menos poluentes que os combustíveis fósseis e de origem renovável, gera um cenário ambientalmente mais atrativo, ampliando a demanda por biocombustíveis e favorecendo a expansão do setor canavieiro (Waclawovsky *et al.*, 2010). Em 2010, a produção brasileira de etanol de cana-de-açúcar atingiu 27 bilhões de litros, evitando a emissão de 130 milhões de toneladas de CO₂ na atmosfera (UNICA, 2011).

Entre os subprodutos da produção de açúcar está o melaço, usado como componente de rações para ruminantes; o bagaço e a palha, que podem ser utilizados para alimentação animal por ser uma fonte de fibras; e a cachaça, obtida da fermentação e da destilação do caldo (CIB, 2009). Além disso, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar são utilizados para produção da bioeletricidade. Esta eletricidade é utilizada para abastecer a própria usina e o excedente pode ser vendido para o sistema elétrico nacional (UNICA, 2011).

Atualmente, o bagaço da cana-de-açúcar vem sendo utilizado para a produção do bioplástico, como na fabricação de vasos, colheres e sacolas plásticas, entre outros objetos (Telles *et al.*, 2011). Através do bioetanol e da bioeletricidade, a cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes como fonte primária e a principal forma de energia renovável no Brasil (Nogueira, 2008). Assim, através do cultivo da cana-de-açúcar, o Brasil se distingue dos demais países por ser capaz de produzir tanto açúcar quanto álcool, em escala industrial (Chieppe Júnior, 2012).

Dessa forma, a produção de cana-de-açúcar com altos rendimentos em terras não cultivadas pode ser a chave para seu desenvolvimento sustentável, evitando concorrência com a produção de alimentos (Waclawovsky *et al.*, 2010). Associada a estratégias de melhoramento genético, o aumento da eficiência e da produtividade pode ser encontrado por meio de novas variedades de plantas adaptáveis às condições de cada região (Goes e Marra, 2008).

2.1.2 Cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar apresenta destaque na agricultura brasileira. Esta cultura ocupa cerca de 8 milhões de hectares ou cerca de 2,3% de toda a área agrícola do País (CONAB, 2011). O Brasil é o maior produtor mundial, produzindo cerca de 721 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, seguido pela Índia e China (FAOSTAT, 2014) (**Figura 1**). O Ministério da Agricultura do Brasil prevê um aumento na produção de 3,25% até 2018/19, através da expansão da área cultivável, pensando nas características agronômicas de cada região, sendo possível acrescentar mais de 2,2 milhões de hectares para a produção de cana-de-açúcar (Brasil, 2013).

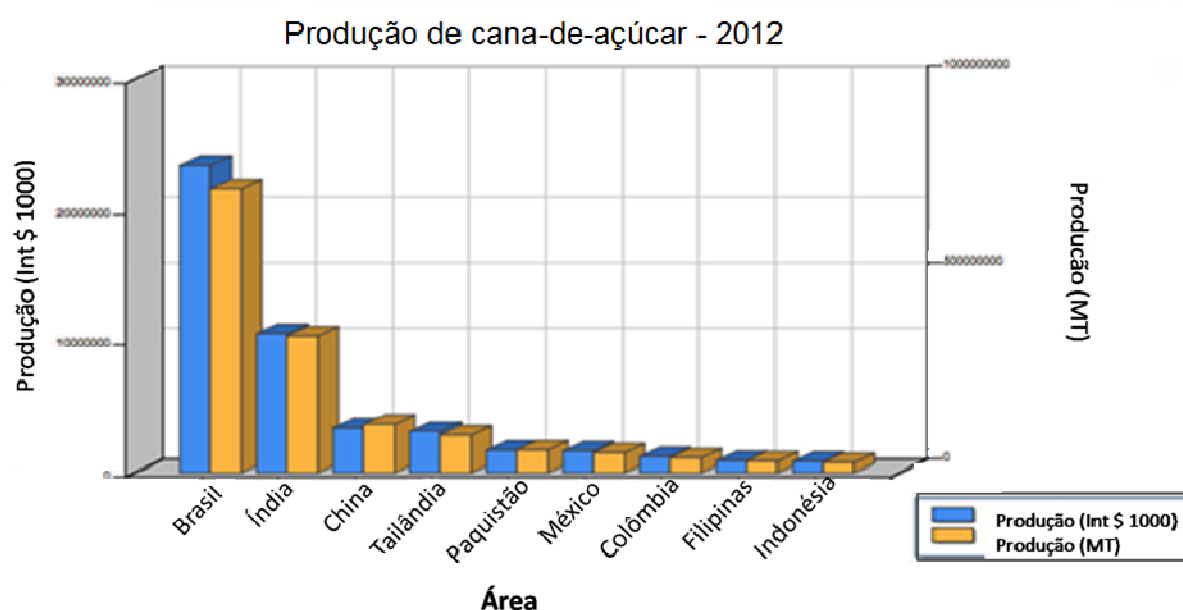


Figura 1. Representação gráfica dos nove maiores países produtores de cana-de-açúcar no ano de 2012 de acordo com a FAOSTAT. O Brasil se encontra como o maior produtor, seguido por Índia e China. Fonte: FAOSTAT (2014) modificado.

Devido a fatores edafoclimáticos, o cultivo da cana-de-açúcar se concentrou historicamente no Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste, permitindo duas safras por ano(UNICA, 2011). Atualmente, encontram-se canaviais em vários estados do Brasil(Figura 2).

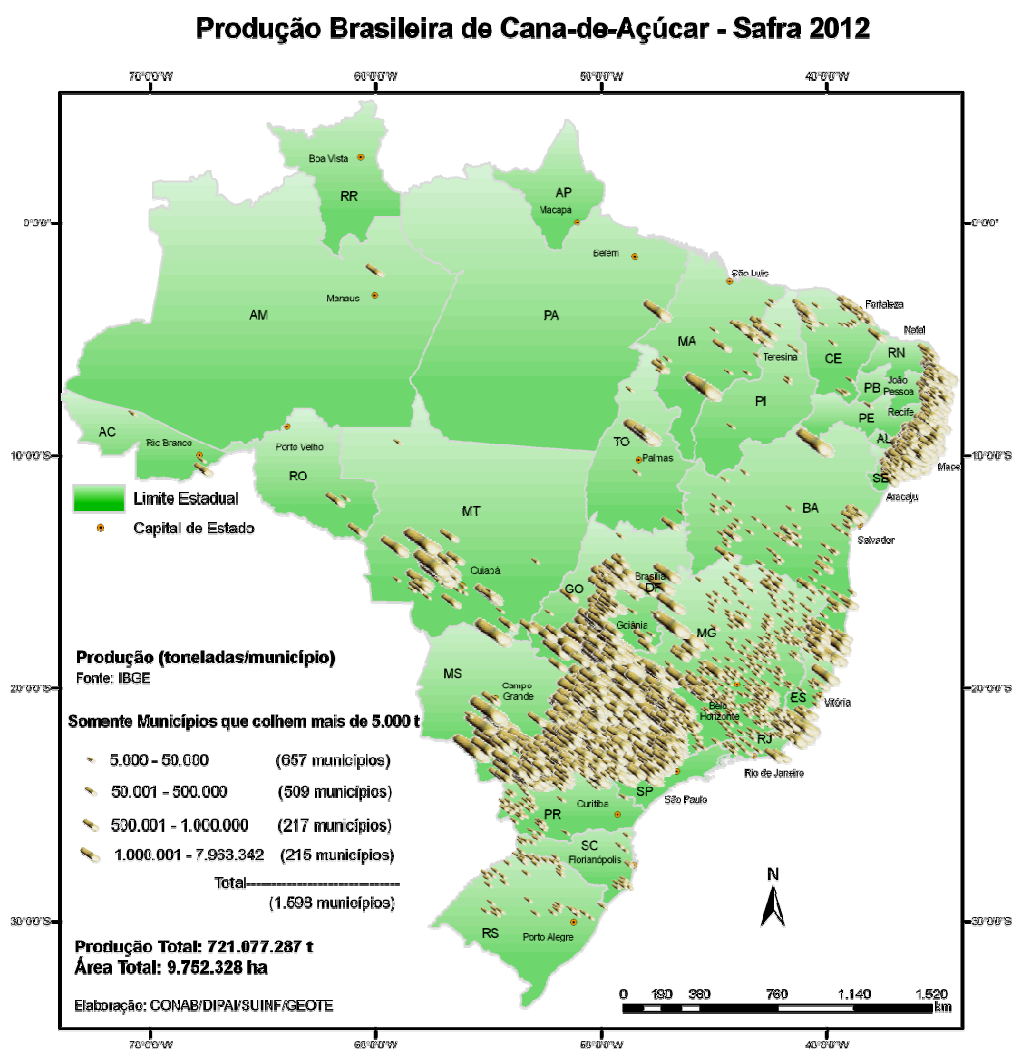


Figura 2. Mapa da produção agrícola de cana-de-açúcar no Brasil. Fonte:CONAB (2013a).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2011), a produtividade da cana-de-açúcar na safra 2011/2012 teve um decréscimo de 9,8% em relação à safra de 2010/11. Essa diminuição está ligada a diversos fatores climáticos, como a estiagem ocorrida em 2010 e a escassez de chuvas em 2011, sendo considerada a maior queda de produtividade dos últimos 40 anos. As chuvas escassas no Nordeste continuaram a afetar o ciclo produtivo da cana-de-açúcar e, conseqüentemente, na concentração de açúcares totais recuperáveis e seus produtos (CONAB, 2013c).

O segundo levantamento da safra 2013/2014 de cana-de-açúcar (CONAB, 2013b) revelou que o Nordeste brasileiro sofreu com a seca no primeiro trimestre de 2013, prejudicando consideravelmente o ciclo da cultura, uma vez que a baixa umidade do solo dificulta o desenvolvimento da soqueira. Essa estiagem ocorrida no Nordeste durante a safra da cana-de-açúcar trará conseqüências para o resultado final do volume de cana-de-açúcar produzido. Esses fatos confirmam como mudanças ambientais podem gerar grandes perdas na produção agrícola.

Dentre os principais fatores abióticos limitantes do crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar em áreas cultivadas, o déficit hídrico é um dos mais importantes no Nordeste brasileiro, sendo necessário investir em estratégias dispendiosas de irrigação da cultura (Prabu *et al.*, 2011). Considerando as previsões de alterações climáticas e de escassez de água em diversas regiões do Brasil, apesar da adaptabilidade da cana-de-açúcar ao calor, será necessária intensa irrigação para manutenção da cultura em boa parte do Nordeste brasileiro (Deconto, 2008) (**Figura 3**). Dessa forma, a manutenção do setor agroindustrial canavieiro no

Brasil demandará desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar tolerantes a déficit hídrico e com maior eficiência de uso dos recursos hídricos disponíveis.

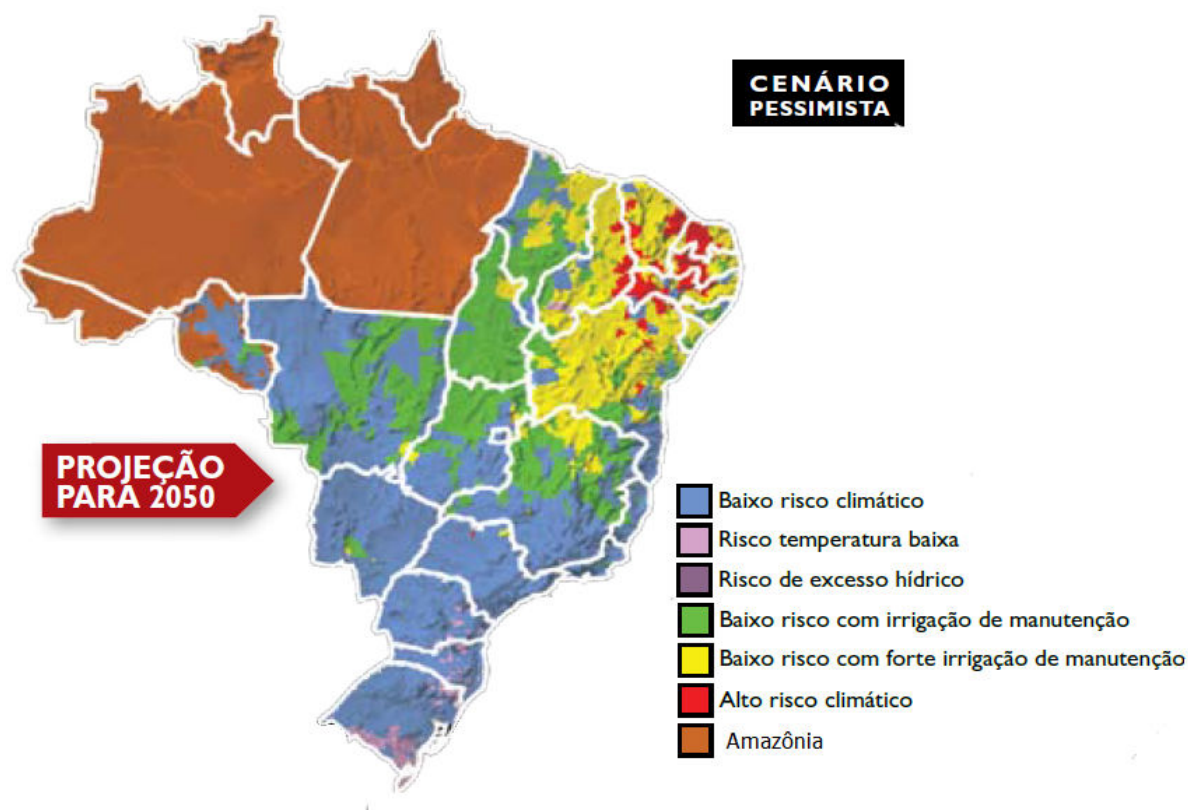


Figura 3. Representação das áreas com plantio favorável de cana-de-açúcar numa projeção para o ano de 2050 com base num cenário pessimista do aquecimento global. Fonte: Deconto(2008) modificado.

A cana-de-açúcar apresenta um desenvolvimento excelente, quando se consegue um sincronismo entre a tecnologia aplicada no cultivo e as condições climáticas favoráveis do local (CONAB, 2011). Portanto, pesquisas que visam obter melhorias de variedades comerciais de cana-de-açúcar tolerantes a fatores abióticos são de grande importância para a economia do País (Menossi *et al.*, 2008).

2.2 ESTRESSES ABIÓTICOS

Diversos fatores bióticos e abióticos contribuíram na evolução das plantas ao longo do tempo. As plantas foram submetidas a diferentes tipos de ambientes definidos pelas condições edafoclimáticas locais, modificando as características dos indivíduos e tornando-as naturalmente tolerantes (**Figura 4**) (Bray *et al.*, 2000). Porém, estes mesmos fatores ambientais podem ser responsáveis por grandes perdas de produtividade de culturas economicamente importantes.

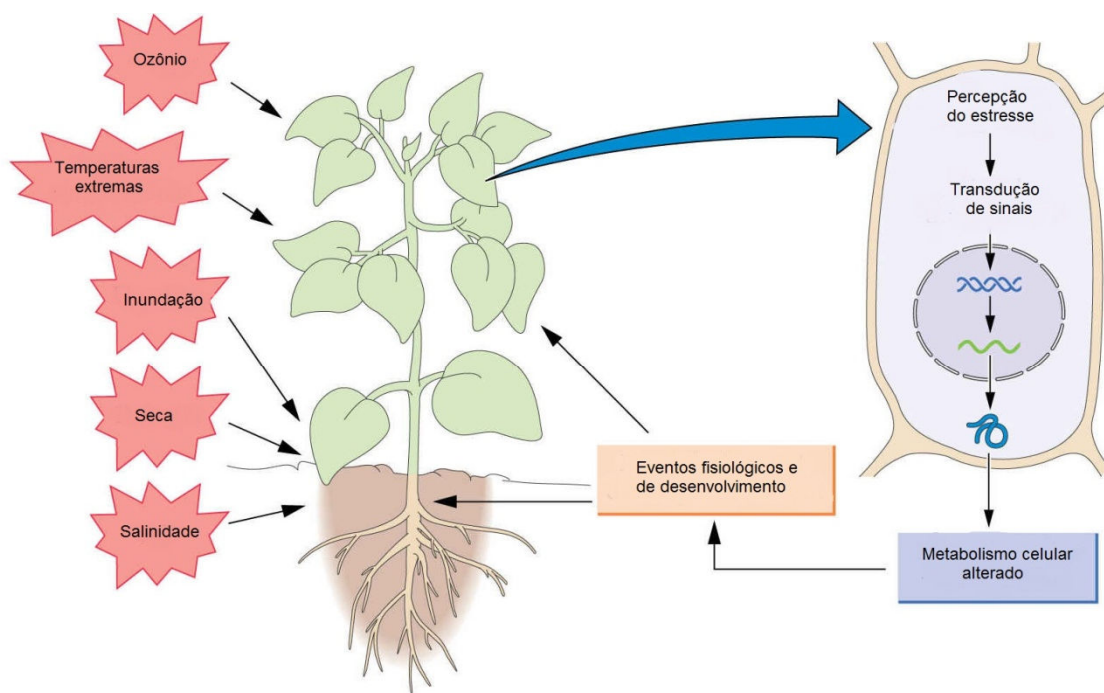


Figura 4. Mecanismos de percepção e respostas das plantas frente a estresses abióticos. Após o reconhecimento de alterações no meio, o sinal é transduzido no interior das células da planta até desencadear alterações fisiológicas para adaptação ao estresse. Adaptado de Bray *et al.* (2000).

Os fatores abióticos mais limitantes da produção vegetal são a seca, a salinidade do solo e as baixas ou altas temperaturas (Benko-Iseppon *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012). A percepção dessas diferentes condições de estresse leva a alterações no perfil de expressão gênica e a ativação de respostas bioquímicas e fisiológicas nas plantas, como o acúmulo de solutos compatíveis e a aceleração de sistemas de remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *Reactive Oxygen Species*) (Scortecci *et al.*, 2012), de forma a propiciar a sobrevivência da planta frente às condições adversas.

Dessa forma, os estresses abióticos são capazes de desencadear uma série de respostas nas plantas, desde modificações morfológicas e fisiológicas, até alterações moleculares e metabólicas, a fim de garantir tolerância a estas condições adversas (Pacheco *et al.*, 2013).

A capacidade de alterar a expressão gênica mediante mudanças ambientais resulta na aclimação das plantas, ou até mesmo na tolerância ao estresse sofrido pelo vegetal (Benko-Iseppon *et al.*, 2011). A identificação dos genes relacionados à resistência ou tolerância ao déficit hídrico tem auxiliado no entendimento da interação entre esses genes e a resposta fisiológica resultante.

2.2.1 Déficit hídrico

O déficit hídrico ocorre quando a quantidade da água disponível no ambiente é insuficiente para atender às necessidades básicas da planta (Bray *et al.*, 2000; Taiz e Zeiger, 2009), fato que afeta negativamente o crescimento vegetal (Osakabe *et al.*, 2014). Para sobreviver em situação de estresse hídrico, mecanismos de aclimação

evoluíram nas plantas em resposta ao estresse, para evitar ou reduzir os possíveis danos causados (Ciarmiello *et al.*, 2011).

Em geral, são ativados mecanismos para evitar a desidratação dos tecidos e mecanismos de tolerância que permitem à planta continuar funcionando nessa situação (Bray *et al.*, 2000; Taiz e Zeiger, 2009). Isso é possível através da ativação de complexas vias moleculares que culminam em alterações fisiológicas, morfológicas e metabólicas a fim de estabelecer a homeostase celular (Soares e Machado, 2007).

As principais alterações morfofisiológicas oriundas da incapacidade de transportar água para as folhas são: enrolamento das folhas, fechamento dos estômatos aumentando a atividade de fotorrespiração (devido à atividade oxigenase da RuBisCO), redução da evaporação e transpiração induzida por ácido abscísico (ABA) e acúmulo de metabólitos. Dessa forma, o potencial hídrico se torna menor, dificultando ainda mais a atração da água (Ciarmiello *et al.*, 2011), porém o acúmulo de osmoprotetores favorece a tolerância ao déficit hídrico (Verslueset *et al.*, 2006).

À medida que o potencial hídrico da planta diminui, as taxas fotossintéticas também diminuem, reduzindo o crescimento vegetal (Shvaleva *et al.*, 2006). Além disso, as taxas de assimilação de carbono caem, dificultando assimilação dos elétrons gerados na cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, uma superprodução de ROS (Azevedo *et al.*, 2011).

Durante a ocorrência do estresse por déficit hídrico, ocorre a diminuição da taxa fotossintética nos cloroplastos devido à baixa assimilação de CO₂, uma vez que ocorre o fechamento estomático aumentando a atividade de fotorrespiração, além da

grande deposição de cutícula nas folhas, afetando a produção de açúcar pela planta (Osakabe *et al.*, 2014).

O decréscimo da entrada de CO_2 afeta diretamente a cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese, aumentando a produção de ROS (Taiz e Zeiger, 2009). A produção de ROS nos cloroplastos, ocorre especificamente nos Fotossistemas I (PSI) e II (PSII), ocasionando o estresse oxidativo à planta (Miller *et al.*, 2010) (Figura 5).

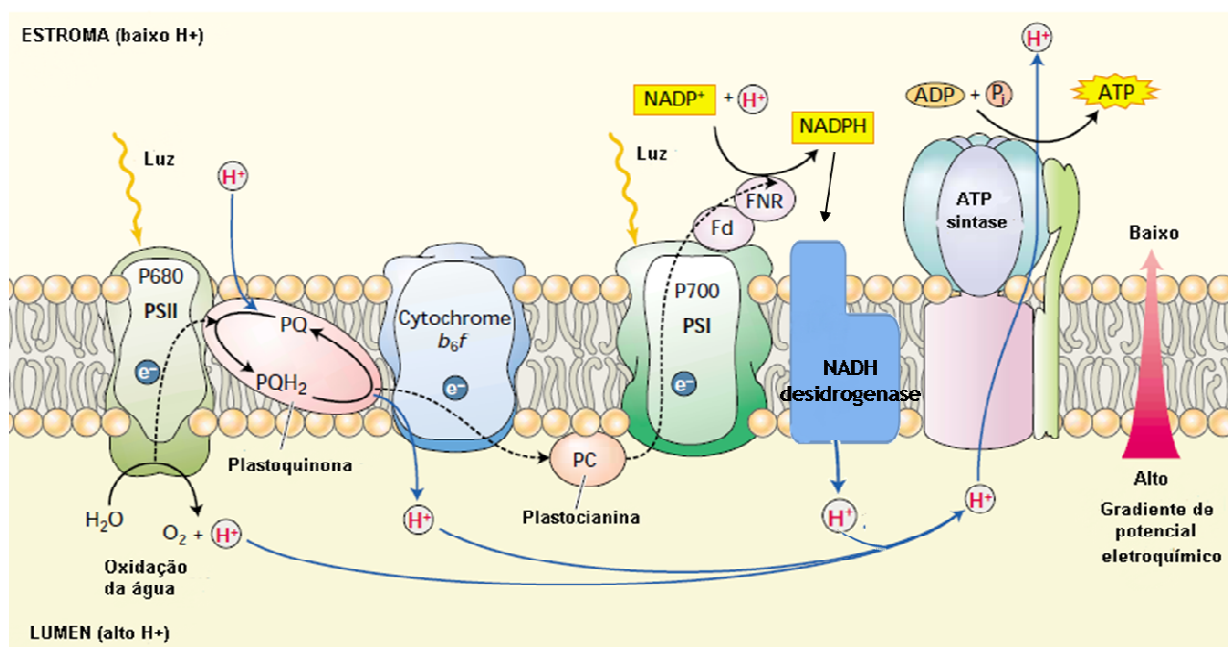


Figura 5. Transporte vetorial de prótons e elétrons nas membranas do tilacóide do cloroplasto através dos fotossistemas II e I, culminando na redução de NADP^+ em NADPH e na síntese de ATP. Fonte: Taiz e Zeiger (2009) modificado.

Os danos oxidativos refletem rapidamente numa redução da taxa de crescimento do vegetal. Desta forma, ocorre uma alteração da expressão gênica para ativar mecanismos de resposta a estresses (Bray *et al.*, 2000). De forma geral,

os estresses bióticos e abióticos inibem a produção de genes relacionados à fotossíntese, seja por interferência na transcrição ou na tradução desses genes (Bilgin *et al.*, 2010; Osakabe *et al.*, 2014).

Assim, a capacidade de controlar a produção de ROS e a limpeza no cloroplasto é essencial para a tolerância à seca (Kosová *et al.*, 2011). Enquanto que plantas sensíveis apresentam baixa capacidade de realizar a limpeza de ROS nessa organela (Miller *et al.*, 2010).

Estudos de perfis de expressão em plantas submetidas a estresse por déficit hídrico são capazes de detectar genes cloroplastidiais suprimidos ou induzidos (Calsa Jr e Figueira, 2007b; Rodrigues F *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2010; Prabu *et al.*, 2011) através de metodologias de análise aberta, como SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), bibliotecas de cDNA, EST e RNA seq. Entretanto, a falta de estudos relacionados diretamente com o perfil de expressão de genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar sob estresses abióticos dificulta a compreensão dos possíveis mecanismos que a planta utiliza para tolerar o estresse sofrido.

Devido à complexidade dos mecanismos de tolerância a estresses são mais conhecidos em plantas modelos como *Arabidopsis* (Bray, 2002). Deste modo, uma melhor compreensão dos genes envolvidos nas respostas à seca em cana-de-açúcar é necessária para caracterizar os mecanismos que permitem a adaptação em condição limitante de água (Bray, 2004).

2.3 CLOROPLASTOS – MAQUINARIA FOTOSSINTÉTICA

O cloroplasto é uma organela que contém toda a maquinaria enzimática necessária para a fotossíntese em plantas e algas, por isso constitui a fonte primária da produtividade mundial de alimentos (Wang *et al.*, 2009). Essa organela é capaz de desempenhar funções relacionadas ao metabolismo de nitrogênio, enxofre e fósforo (Taiz e Zeiger, 2009), além de ser responsável pela biossíntese de ácidos graxos, aminoácidos, pigmentos e vitaminas (Saski *et al.*, 2005). Porém, a função mais importante do cloroplasto é a fotossíntese, processo biológico responsável pela produção de trioses fosfato a partir da energia luminosa (Taiz e Zeiger, 2009).

No cloroplasto ocorrem as reações luminosas (fase dependente de luz) e o ciclo de Calvin (fase independente de luz) da fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2009). Nas reações luminosas, a energia solar é convertida em energia química na forma de ATP e NADPH, através da fotólise da água. Essa conversão ocorre nos fotossistemas, complexos proteicos capazes de absorver energia luminosa e desencadear a transferência de elétrons que reduzem NADP^+ a NADPH e oxidar H_2O a O_2 . No ciclo de Calvin, ocorre a fixação de CO_2 pela ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO), e juntamente com o ATP e o NADPH, produzidos na fase clara, são produzidas as trioses fosfatos (G3P) (**Figura 6**), as quais são direcionadas ao citoplasma para a síntese de sacarose (Tikhonov, 2013a).

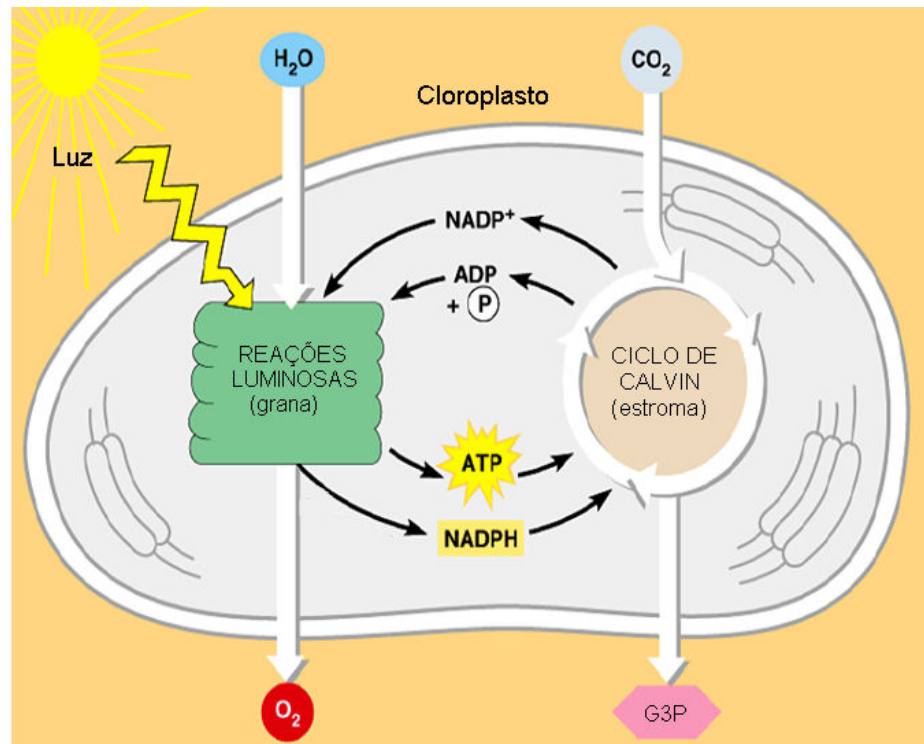


Figura 6. Esquema geral da fotossíntese. Fonte: Copyright © 2003 Pearson Education. Inc., publishing as Benjamin Cummings, modificado.

Assim como as mitocôndrias, os cloroplastos apresentam DNA, RNA e ribossomos próprios, transcrevendo e traduzindo parte de suas proteínas, apresentam segregação não mendeliana; de forma que os cloroplastos herdados são comumente de origem uniparental (Wanget *al.*, 2009). Na maioria das angiospermas a herança cloroplastidial é materna; assim, os cloroplastos de origem paterna são degradados antes da fertilização (Borgonove e Silva-Filho, 2010). Essa característica típica dos plastídios os torna excelentes alvos para incorporação de transgenes, promovendo uma contenção dos transgenes pela falta de fluxo gênico através do pólen (Daniell *et al.*, 2005; Clarke e Daniell, 2011), como demonstrado em tabaco e tomate (Lössl e Waheed, 2011).

2.3.1 Genoma cloroplastidial de cana-de-açúcar

O genoma cloroplastidial ou plastoma das plantas superiores é uma molécula circular de dupla fita de DNA com estrutura altamente conservada, conteúdo gênico variando entre 120-130 genes, tamanho em torno de 120-180 kilobases (Kb) (Tangphatsornruang *et al.*, 2009). A poliploidia é uma característica marcante dos cloroplastos, as diversas cópias do DNA cloroplastidial (cpDNA) estão localizadas no estroma, em regiões denominadas nucleóides. Estes não são delimitados por uma membrana, mas possuem proteínas que mantêm o DNA agregado (Alves, 2005; Carrer, 1998).

O genoma cloroplastidial da cana-de-açúcar (acesso NC_005878.2), completamente sequenciado por Calsa Jr. e colaboradores (2004), possui 141.182 pares de bases (pb), contendo um par de regiões repetidas invertidas (IRa, IRb; do inglês *Inverted Repeat Regions*) de 22.794 bp cada. Essas regiões são separadas por uma região pequena de cópia única (SSC; do inglês *Small Single Copy*) de 12.546 pb e uma região longade cópia única (LSC; do inglês *Large Single Copy*) de 83.048 pb (**Figura 7**). Apresenta 116 genes, sendo 82 codificantes de proteínas, quatro genes codificantes de RNA ribossomal (rRNA) e 30 genes de RNA transportador (tRNA), além de 16 genes *ycf* (*hypothetical chloroplast open reading frames*).

Dentre os genes codificantes de proteínas, tem-se os codificantes do Fotossistema I (*psa*), Fotossistema II (*psb*), Complexo citocromo b_6f (*pet*), complexo ATP sintase (*atp*) e o Complexo NADH desidrogenase (*ndh*). Essas famílias gênicas estão diretamente relacionadas com o processo fotossintético e, conseqüentemente, com a produção de sacarose pela cana-de-açúcar. Além dessas famílias gênicas, o gene cloroplastidial *rbcL*, codificante da subunidade maior da RuBisCO, está diretamente relacionado ao processo fotossintético pela fixação do CO₂ atmosférico para produção de G3P (Tikhonov, 2013a).

O conhecimento da estrutura do genoma cloroplastidial dos organismos auxilia em estudos de evolução e de relações fenéticas e filogenéticas (Wojciechowski *et al.*, 2004; Tangphatsornruang *et al.*, 2009). Entretanto, a simples informação da sequência de bases que compõe um genoma não garante a revelação da função e dos mecanismos de controle da expressão gênica presentes no genoma (Rabbani *et al.*, 2003; Rensink e Buell, 2005). Portanto, o estudo do perfil de expressão tem sido utilizado para identificar genes envolvidos na resposta adaptativa à seca e outros estresses abióticos em diversas espécies (Menossi *et al.*, 2008).

Dessa forma, o estudo das famílias gênicas relacionadas aos fotossistemas e demais complexos proteicos envolvidos no processo fotossintético em plantas submetidas a estresses abióticos, pode revelar se há mecanismos cloroplastidiais que auxiliam na sobrevivência e na tolerância ao estresse sofrido.

2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO

No Brasil, a biotecnologia para o melhoramento da cana-de-açúcar começou a ser utilizada na década de 90, com mapas genéticos e obtenção das primeiras plantas modificadas geneticamente (CIB, 2009). Diversas instituições de pesquisa passaram a financiar estudos para identificação dos genes envolvidos no processo de crescimento, no teor de açúcar e na resistência a diversos tipos de estresses, entre outras características importantes para aumentar a produtividade comercial da cultura. O uso dessa informação permite o desenvolvimento mais rápido de novas variedades por meio da seleção assistida por marcadores (Menossi *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar com alta eficiência no uso de água e tolerância a estresses visa minimizar seus efeitos fisiológicos, para manter níveis ideais de sacarose em seu colmo. O conhecimento do perfil de expressão gênica desta cultura torna-se uma alternativa na identificação das vias e dos genes que regulam a resposta aos estresses. Para isso, é preciso entender os mecanismos moleculares básicos que as plantas utilizam para alterar sua fisiologia e se adaptar ao fator de estresse ambiental (Scortecci *et al.*, 2012).

Nesse contexto, a utilização da metodologia de sequenciamento e análise de EST (*Expressed Sequence Tag*) têm sido eficiente para identificar genes expressos durante determinada condição ambiental nas plantas (Gupta *et al.*, 2010). Entretanto, relativamente poucos estudos têm focado na expressão de genes localizados no plastoma de cana-de-açúcar potencialmente responsivos a estresses abióticos (Calsa Jret *al.*, 2004).

2.5 TÉCNICAS DE ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A análise da expressão gênica dispõem de diversas técnicas atualmente, como *Northern blot*, DNA *Microarrays*(Microarranjo), SAGE (*Serial Analysis for Gene Expression*– Análise Serial da Expressão Gênica),EST(*Expressed Sequence Tag* – Região de Sequência Expressa), PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) e RNAseq, entre outras. A principal diferença entre essas técnicas está relacionada ao tipo de análise empregada.

As tecnologias de SAGE, EST e RNA seq não necessitam conhecimento prévio das sequências dos transcritos, sendo possível à identificação de transcritos desconhecidos (Nielsen *et al.*, 2003). Essas metodologias caracterizam uma análise de expressão gênica do tipo aberta e seus dados são utilizados para anotação de sequências genômicas. Em contrapartida, análises fechadas, como a maioria dos microarranjos de DNA (DNA *Microarray*) e PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR), são baseadas na sequência dos genes analisados, para o desenho de sondas e *primers* que se ligam aos transcritos conhecidos (Kuo *et al.*, 2002), sendo os dados gerados usados para experimentos focalizados de quantificação da expressão (Yuen *et al.*, 2002).

2.5.1 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A qPCR permite a quantificação dos níveis de mRNA de genes de interesse em diferentes condições (Bustin, 2000). Essa tecnologia tem auxiliado na compreensão dos mecanismos envolvidos e no desenvolvimento de estratégias moleculares para o aumento da tolerância a estresses em diversos organismos (Volkov *et al.*, 2003; Kasuga *et al.*, 2004).

A técnica de qPCR foi descrita pela primeira vez em 1992 por Higuchi e colaboradores. Nessa técnica é possível acompanhar em tempo real cada ciclo de amplificação da PCR pelo aumento da emissão de fluorescência, que ocorre pela ligação de fluoróforos intercalantes em DNA dupla fita. Assim, é possível acompanhar a cinética de amplificação pelo acúmulo e detecção de sinal de fluorescência a cada ciclo de amplificação (Higuchi *et al.*, 1993; Wittwer *et al.*, 1997). Com a finalidade de aumentar a sensibilidade da técnica o brometo de etídio foi substituído por outros corantes fluorescentes (Schneeberger *et al.*, 1995). Os fluoróforos comumente utilizados são corantes intercalantes de DNA inespecíficos (SYBR Green®, EVA Green®) e sondas fluorescentes por hidrólise do tipo TaqMan®.

O sistema SYBR Green® utiliza um corante intercalante de DNA dupla fita que fluoresce após sua ligação. Durante a PCR, a amplificação da sequência-alvo produzirá *amplicons* dupla fita, onde múltiplas moléculas de SYBR Green® poderão se ligar e emitir uma fluorescência forte (Life Technologies Corporation, 2012). Esse sistema é útil para verificação de qualquer molécula dupla fita presente na amostra. Contudo, a ligação inespecífica do corante pode levar a uma emissão de sinal

fluorescente durante a ligação a artefatos da reação, como dímeros de *primers* e erros de amplificação (Zipper *et al.*, 2004).

A PCR em tempo real apresenta três fases características: amplificação exponencial, linear e estacionária ou *plateau* (platô). Na primeira fase, amplificação exponencial, a quantidade de *amplicons* é detectável como sinal fluorescente, ocorrendo duplicação do número de *amplicons* ao final de cada ciclo. Durante a fase linear o aumento no número de cópia dos *amplicons* passa a ser linear, à medida que os reagentes vão se tornando limitantes. Enquanto que na fase estacionária não há produção de *amplicons* devido à falta ou esgotamento de reagentes (Freeman *et al.*, 1999). A fase de amplificação exponencial é a etapa mais importante para a análise dos dados. Nessa fase pode-se estabelecer uma relação entre a quantidade de *amplicon* produzido e a quantidade inicial do DNA alvo ou gene alvo. A **Figura 8** mostra um gráfico de qPCR com suas fases identificadas.

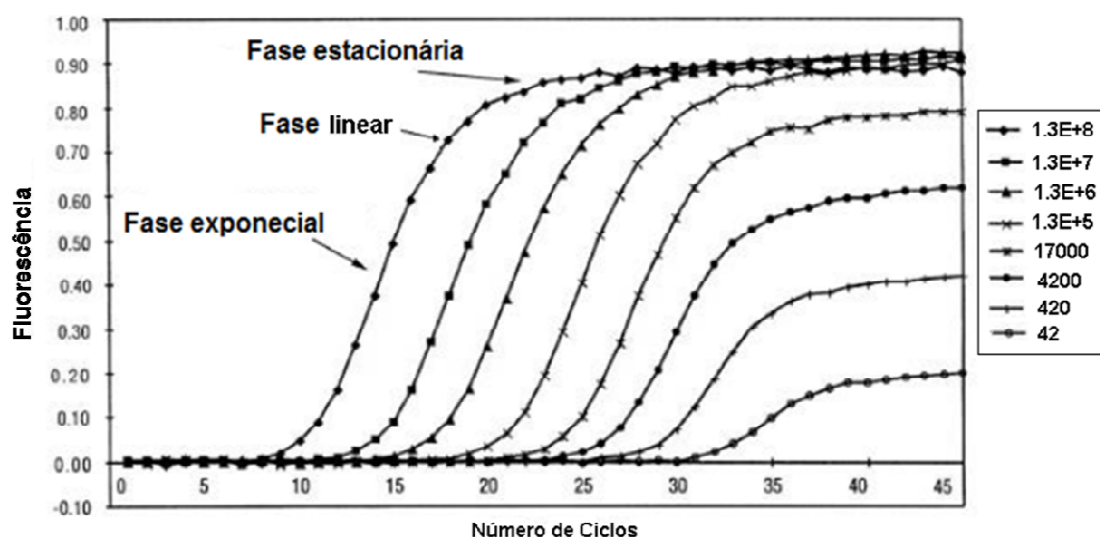


Figura 8. Representação gráfica das fases da PCR quantitativa, relacionando o número de ciclos com o aumento da quantidade do sinal fluorescente e do produto. Adaptado de Wittwer *et al.* (1997).

A interpretação dos dados provenientes do termociclador necessita do esclarecimento de alguns conceitos típicos de uma reação de PCR em tempo real: *threshold*, Cq (ciclo de quantificação) e eficiência da amplificação. O *threshold* é uma linha arbitrária indicada no gráfico de amplificação com o objetivo de eliminar o “ruído de fundo” do equipamento, correspondendo ao limiar mínimo de detecção de fluorescência do equipamento. O ponto Cq, corresponde ao número de ciclos onde a curva cinética da reação atinge uma fluorescência limiar, o *threshold*. Esse ponto pode ser definido pelo pesquisador ou gerado automaticamente pelo equipamento, devendo estar posicionado na fase exponencial da curva. O valor do Cq de uma reação é dependente da quantidade de moléculas presente na amostra, então, um menor número de inicial de moléculas necessita de um número maior de ciclos para gerar um aumento exponencial do sinal da fluorescência (Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). A eficiência (Eff) da amplificação de cada gene analisado deve variar idealmente entre 90% e 100% ($-3.6 > slope > -3.1$), podendo ser determinada através da equação: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Em uma situação ideal, a quantidade de *amplicons* deve dobrar a cada ciclo de amplificação, correspondendo a uma eficiência de 100%.

Além desses parâmetros, é necessário adicionar uma curva de dissociação (*melting*) do *amplicon*, a fim de validar o ensaio quando se utiliza fluoróforos intercalantes de DNA, como o SYBR Green[®]. A curva baseia-se na temperatura de *melting*, onde 50% dos *amplicons* estão dissociados. Para tanto, o produto da PCR é submetido a várias temperaturas para determinação do pico de dissociação. A presença de um único pico na curva assegura que somente o alvo dos *primers* foi

amplificado, sendo capaz de detectar a presença de produtos inespecíficos e dímeros de *primer*.

A análise de quantificação por qPCR pode ser feita em níveis absolutos (quantificação absoluta) ou níveis relativos (comparação entre amostras, quantificação relativa). O método mais utilizado para quantificação relativa é o da comparação do limiar da fase exponencial ($2^{-\Delta\Delta Cq}$). Este método se baseia que a reação está ocorrendo com eficiência de aproximadamente 100% e que existem genes com expressão constante nas amostras (genes de referência). Assim, podem-se comparar os valores Cq das amostras com um controle, sendo esses valores normalizados a um gene de referência apropriado. Para cada amostra, calcula-se a diferença de valores de Cq entre o gene alvo e o de referência (ΔCq). Posteriormente, subtrai-se o valor de ΔCq da condição controle do valor de ΔCq da condição tratada ($\Delta\Delta Cq$). O valor obtido é referido como quantificação relativa (VanGuilder *et al.*, 2008) (**Figura 9A**).

A $\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene referência}}$ $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratado}} - \Delta Ct_{\text{controle}}$ $\text{Razão} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$	B $\text{Razão} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta Ct_{\text{gene alvo (controle - tratado)}}}}{(E_{\text{referência}})^{\Delta Ct_{\text{referência (controle - tratado)}}}}$
--	--

Figura 9. Exemplificação das fórmulas de cálculo para expressão gênica por PCR em Tempo Real, descritas pelo método $\Delta\Delta Cq$ (VanGuilder *et al.*, 2008) (A) e pelo método do programa REST (Pfaffl *et al.*, 2002) (B).

O programa *Relative Expression Software Tool* REST (Pfaffl *et al.*, 2002) realiza uma estimativa de expressão gênica com nível de significância entre os genes alvo e genes de referência, com base no método $\Delta\Delta C_q$; porém é capaz de corrigir as diferenças na eficiência da cada *primer*. Por isso, é possível utilizá-lo para comparar genes com eficiências de amplificação distintas (**Figura 9B**).

Atualmente, a técnica de qPCR é a mais precisa para quantificar níveis de expressão de determinado gene em diversas condições, além de oferecer dados rápidos e reprodutíveis (Ginzinger, 2002). Em razão disso, a qPCR foi escolhida para realizar a análise da expressão diferencial de genes do cloroplasto de cana-de-açúcar, que já possui genoma sequenciado.

3. Objetivos

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de expressão de genes cloroplastidiais em variedades de cana-de-açúcar contrastantes para o estresse por déficit hídrico comparativamente a seus controles não estressados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar genes cloroplastidiais codificantes de subunidades de fotossistemas, complexos citocromo b_6f , NADH desidrogenase e ATP sintase, além do gene codificante da subunidade maior da RuBisCO, expressos em bibliotecas de cDNA disponíveis em bancos de dados transcricionais de cana-de-açúcar;
- Avaliar o perfil transcricional dos genes selecionados pelo uso da técnica RT-qPCR, em variedades contrastantes para tolerância, submetidas ou não ao estresse por déficit hídrico;
- Identificar pelo menos quatro genes candidatos, com maior associação a resposta de tolerância ao estresse analisado.

4. Material e Métodos

4.1 ANÁLISES *IN SILICO*

Partindo da sequência referência do plastoma de cana-de-açúcar (Calsa Jr *et al.*, 2004; acesso NC_005878.2), as sequências nucleotídicas dos genes cloroplastidiais pertencentes às famílias *psa*, *psb*, *pet*, *ndh* e *atp*, além do gene *rbcL*, foram analisadas por meio da ferramenta BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) contra o banco de dados transcricionais de acesso público no TIGR Gene Index de cana-de-açúcar (SoGI Gene Index; http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=s_officinarum), composto majoritariamente a partir de dados do projeto SUCEST (Vettore *et al.*, 2001). A partir da análise do perfil de expressão *in silico*, selecionou-se os TC's (*Tentative Consensus* – união de várias *reads* para formar um *contig*), que apresentaram maior correlação de expressão em bibliotecas de cDNA em folhas de cana-de-açúcar.

Os *primers* específicos foram desenhados a partir da sequência dos genes selecionados com o auxílio do programa Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000; <http://frodo.wi.mit.edu/>) para amplificação por PCR em tempo real (qPCR). Os limites estipulados de temperatura de anelamento foram de 50 a 60°C, tamanho do *amplicon* foi de 50 a 150 pb, conteúdo GC de 50%, fator de auto-complementariedade máxima inicial de 3,0 e fator de auto-complementariedade na região 3' de 0, conforme parâmetros recomendados por Calsa Jr e Figueira (2007b). O par de *primers* selecionado para cada gene foi testado quanto a: estabilidade, temperatura de anelamento e interações entre *primers* (dímeros, heterodímeros e grampos), através do programa NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com>

/netprimer/index.html) e sua especificidade foi verificada em bancos de dados por BLASTn.

4.2 MATERIAL VEGETAL

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), através de colaboração com o Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da UFRPE e o Laboratório de Genômica Funcional da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2 correspondendo a duas variedades de cana-de-açúcar, RB72454 (sensível à seca) e RB92579 (tolerante à seca) e dois tratamentos (controle e déficit hídrico por oito dias), com três repetições para cada tratamento, totalizando 12 unidades experimentais (**Figura 10**).



Figura 10. Experimento montado em casa-de-vegetação (Laboratório de Fisiologia Vegetal/UFRPE) 90 dias após transplântio e aclimação, antes do início dos tratamentos.

As variedades de cana-de-açúcar foram gentilmente cedidas pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA) procedentes da Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina (EECAC/UFRPE), localizada a 56 km da cidade do Recife-PE.

As plantas utilizadas foram propagadas assexuadamente, utilizando-se fragmentos de secção transversal dos colmos com aproximadamente 10 cm de comprimento e contendo uma gema, os quais foram colocados para brotação em bandejas com capacidade para 17 kg contendo solo da mesma região. Um mês após o plantio, as plântulas com aproximadamente 20 cm e 3 folhas foram transferidas para vasos de polietileno com capacidade para 15 kg de solo identificado como franco-argilo-arenoso. O período experimental, incluindo transplântio, aclimação, aplicação dos tratamentos e avaliação das variáveis fisiológicas foi de maio a setembro de 2011.

Durante o período de 90 dias, os vasos foram mantidos na capacidade de pote (100%) determinada previamente pelo método gravimétrico. Para tanto, a superfície dos vasos foi coberta com circunferências de plástico branco para evitar a perda de água do solo por evaporação. Foi feita a reposição da água transpirada diariamente através do método da pesagem dos vasos. Após esse período foi realizada a suspensão da rega.

4.2.1 Parâmetros fisiológicos

Os parâmetros fisiológicos foram analisados no Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE, coordenado pela Prof. Dra. Rejane Jurema Mansur Custódio Nogueira, a fim de mensurar o déficit hídrico.

As avaliações das trocas gasosas foram realizadas no oitavo de exposição à seca, no horário entre 11 e 13 horas, com analisador portátil de gases a infravermelho (IRGA), ADC, modelo Lci, (Hoddesdon, UK). As medidas foram feitas na parte abaxial da folha +1 (folha mais nova com lígula visível), avaliando a taxa de fotossíntese (A), transpiração (E) e concentração de CO₂ intracelular (Ci).

No oitavo dia após a suspensão da rega foi avaliado o potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}), o qual foi determinado nas folhas +1, mediante uso da câmara de pressão de Scholander (Scholander *et al.*, 1965) ao meio-dia (12 h).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software ASSISTAT 7.7 (Silva e Azevedo, 2009).

4.3 ANÁLISE DO PERFIL GÊNICO

Para obtenção das amostras para a análise do perfil gênico foram coletadas as folhas +1, a folha mais jovem que apresenta lígula visível, das três réplicas biológicas de cada tratamento com auxílio de tesoura previamente limpa com etanol a 70%, conforme denominação de van Dillewijn e Waltham (1952). As amostras coletadas foram cortadas em frações menores, colocadas em tubos do tipo Falcon, imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

4.3.1 Extração e Quantificação de RNA

O RNA total foi extraído a partir de 250 mg de folhas de cana-de-açúcar utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen™). Essa metodologia de extração de RNA permite o isolamento de RNA total de qualidade, além de facilitar o isolamento de RNAs de vários tamanhos (Chomczynski e Sacchi, 1987). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até se obter um pó fino, adicionou-se 1ml de TRIzol® seguido de homogenização por 15 s, incubação por 2 min no gelo e centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 4°C. A fase aquosa foi recolhida para tubo novo e adicionou-se 0,5 V de clorofórmio PA gelado, seguido de homogeneização por 15 seg e centrifugação a 12.000 x g por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubo novo e precipitada com isopropanol por 10 min no gelo. Posteriormente, centrifugaram-se as amostras a 12.000 x g por 10 min a 4°C. Em seguida, o precipitado (*pellet*) de RNA foi lavado em etanol 70% (v/v) e centrifugado

a 7.500 x g por 10 min a 4°C. Os RNAs foram dissolvidos em água tratada com dietil-pirocarbonato 0,01% (H₂O DEPC) e estocados a -80°C.

A integridade do RNA extraído foi verificada em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, para visualização dos rRNAs 28S e 18S. O gel foi submetido a corrente de 70V por 40 min, tendo como marcador de peso molecular DNA Ladder® 1kb (Invitrogen™). As bandas de RNA foram visualizadas por meio de coloração com corante fluorescente EZ-Vision® (Amresco®) em transiluminador-UV e fotografado com câmera digital. As fotos foram processadas em editor de fotos PhotoScape (Mooii Tech).

A concentração do RNA extraído foi medida por espectrofotometria em espectrofotômetro Biowave DNA (Biochrom). A pureza do RNA extraído é calculada pela razão entre as absorbâncias A_{260} e A_{280} , a qual deve permanecer em torno de 1,8 - 2,0. Valores inferiores a 1,8 indicam que a amostra pode estar contaminada por proteínas ou lipídeos, e valores superiores a 2,0 indicam que a amostra pode estar contaminada por fenóis. A razão A_{260}/A_{280} para ambas as variedades estudadas se encontram no intervalo desejável de pureza, evitando que contaminantes na amostra e resquícios de reagentes da extração interfiram no rendimento da qPCR (Bezerra, 1998).

4.3.2 Tratamento com DNase I e Síntese de cDNA

Após a quantificação, 5 µg do RNA extraído de cada amostra foi submetido a tratamento com a enzima DNase I, livre de RNase (Thermo Scientific™). Seguiu-se as especificações do fabricante utilizando 1U da enzima DNase I para cada µg de RNA, tampão de reação com MgCl₂ (10x) e água destilada e deionizada tratada com DEPC 0,01% para volume final da reação de 10 µl. A reação foi incubada a 37°C por 30 min. Em seguida foi adicionado o tampão de EDTA 50 mM à reação e incubada a 65°C por 10 min para inativação da enzima.

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se o RNA tratado com DNase I, seguindo as especificações do kit Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen™). Escolheu-se utilizar *primers* randômicos para a síntese de cDNA, de forma a conseguir amplificar RNAs cloroplastidiais dispersos no RNA total (Calsa Jr. e Figueira, 2007a). Para tanto, adicionou-se 500 ng dos *primers* hexâmeros randômicos, 5 µg do RNA tratado, 10 mM de dNTPs e água destilada tratada com DEPC 0,01% para volume final de 12 µl. O RNA foi desnaturado a 65°C por 5 min e resfriado a 4°C por 5 min. Em seguida foi adicionado 0,1 M DTT, tampão 5x, 1 U RNase OUT™, 15 u da enzima Cloned AMV Reverse Transcriptase e água destilada tratada com DEPC 0,01% para ajuste do volume final da reação de 8 µl.

A reação de transcrição reversa foi realizada no termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) nas seguintes condições de ciclagem: 25°C por 10 min, 45°C por 40 min e 85°C por 5 min, depois armazenado a -20°C.

4.3.3 Amplificação do DNA e cDNA por PCR convencional

De forma a testar a integridade e qualidade dos *primers* sintetizados, realizou-se uma PCR utilizando DNA total de folhas de cana-de-açúcar, extraído pelo método CTAB 2% (Doyle e Doyle, 1991). Posteriormente, realizou-se uma PCR a partir de um *pool* de cDNA, composto pela junção equimolar das triplicatas biológicas das amostras controles de ambas as variedades de cana-de-açúcar. Em ambas as reações utilizaram-se os 12 *primers* desenhados, além dos quatro *primers* para os genes de referência.

As PCRs foram conduzidas em termociclador GeneAmp Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems), utilizando tampão PCR 10X, 10 mM de dNTP mix, 50 mM de MgCl₂, 0,5 µM de *primers* específicos e 1 u de Taq-DNA polimerase. A amplificação foi realizada de acordo com o programa: 94°C por 2 min para desnaturação, 35 ciclos de amplificação correspondendo a 94°C por 15 s, 60°C por 30 s e 72°C por 1 min; e com extensão final a 72°C por 5 min.

Da mesma forma, uma PCR convencional foi conduzida para testar a qualidade do cDNA sintetizado de cada tratamento, utilizando os *primers* específicos para o gene *Actina*.

As amplificações foram evidenciadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (5 µg ml⁻¹).

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

As reações de PCR em Tempo Real foram conduzidas empregando a tecnologia SYBR Green® (Molecular Beacons), utilizando o kit Rotor-Gene SYBR Green PCR (Qiagen) no sistema Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) disponibilizado pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Pernambuco. A reação de amplificação foi realizada num volume final de 12µl, contendo 1µl do cDNA diluído (1:2), a concentração ideal de cada *primer*, 2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix e água ultrapura (Milli-Q) estéril. A reação ocorreu em três etapas: 95°C por 10 min; seguidos de 40 ciclos de: desnaturação a 95°C por 30 s, temperatura de anelamento ótima de cada par de *primer* por 30 s e extensão a 60°C por 60 s. Ao final da ciclagem, o produto obtido foi submetido a um aquecimento gradual de 60 até 95°C, para obtenção da curva de dissociação (*melting*).

O experimento de PCR em tempo real incluiu amostras em triplicatas biológicas (plantas distintas) e triplicatas técnicas (reações distintas a partir de uma mesma amostra), controles negativos NTC (*No Template Control* – reação de PCR sem o cDNA) e triplicatas do controle RT minus (*Reverse Transcriptase minus* – reação de síntese de cDNA sem adição da enzima RT).

4.4.1 Normalização e Eficiência da qPCR

Os pares de *primers* foram testados para determinar a concentração associada à obtenção do menor ciclo de quantificação (Cq), o qual não favorece a formação de dímeros. Para tanto, utilizou-se as seguintes concentrações de cada um dos pares de *primers*: 0,25 µM, 0,4 µM, 0,5 µM e 0,7 µM.

Além disso, elaborou-se uma curva padrão composta por triplicatas de cinco diluições seriadas (180 ng, 90 ng, 45 ng, 22,5 ng e 11,25 ng) a partir da junção do cDNA das amostras controle de ambas as variedades estudadas. Assim, foi possível verificar as eficiências de amplificação dos genes alvo e dos genes de referência.

A eficiência dos *primers* (Eff) para a amplificação foi determinada a partir do valor de *slope*(M) (inclinação da reta) da curva padrão, sendo considerados valores em torno de -3, o que indica uma reação com 100% de eficiência. O coeficiente de correlação de Pearson (R^2) resultante da análise da curva padrão foi considerado como valor ideal quando acima de 0,80. A eficiência de amplificação da PCR deve ter valor igual a 1,0 (100%), correspondendo à taxa na qual um *amplicon* de PCR é gerado, sendo considerados satisfatórios valores entre 90 e 120%.

4.4.2 Delineamento experimental

A expressão gênica foi avaliada em triplicatas (3) de cada tratamento (controle e seca por oito dias) para cada gene de interesse (n=12) para o órgão folha. Foram avaliados quatro genes de referência: genes de cana-de-açúcar ortólogos aos que codificam as proteínas de arroz β -actina (Actina), Tubulina β -2/ β -3 (Tubulina), poliubiquitina 2 (UbiQ2) (Iskandar *et al.*, 2004), bem como a proteína ribossômica *rpl35-4* (Calsa Jr e Figueira, 2007b) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Genes de referência de cana-de-açúcar para teste de estabilidade na qPCR. Sequência dos *primers*, número de acesso (TC n°) e tamanho do *amplicon* (pb). O TC n° corresponde ao número de identificação da sequência (*tentative consensus*) no banco de dados de ESTs de cana-de-açúcar (TIGR Gene Index).

Gene	Primers		TC n°	Amplicon	Referência
	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')			
<i>Actina</i>	CTCAACCCCAAGGCTAACAG	GGCATGAGGAAGGGCATAA	TC23717	195 pb	Iskandar <i>et al.</i> , 2004
<i>Tubulina</i>	CTCCACATTCATGGCAACTC	TCCTCCTCTTCTTCCTCCTCG	TC48524	103 pb	Iskandar <i>et al.</i> , 2004
<i>UbiQ2</i>	CTTCTTCTGTCCCTCCGATG	TCCAACCAAAGTCTGCTC	TC56667	159 pb	Iskandar <i>et al.</i> , 2004
<i>rpl35-4</i>	CTGAAGACGGAGAGGGAAAA	GGCGAAGAGAACTAACAC	TC57186	264 pb	Calsa Jr e Figueira, 2007b

Gene de referência é aquele gene responsável por funções básicas de importância elevada para a manutenção do funcionamento celular, cuja expressão é dita constante nos diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento do organismo. O gene de referência deve ser selecionado para ser o referencial da quantificação relativa, mantendo uma expressão constante em todos os tratamentos realizados (Huggett *et al.*, 2005). A escolha incorreta do gene de referência pode resultar na interpretação equivocada da expressão biológica real dos genes de interesse.

Os genes de referência foram analisados pelos programas estatísticos GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002; <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) e NormFinder (Andersen *et al.*, 2004; <http://moma.dk/normfinder-software>), permitindo o cálculo da variação da expressão. Além disso, foi avaliado se é possível utilizar um gene ou mais como referência de expressão do ensaio (Andersen *et al.*, 2004).

O programa geNorm permite o cálculo de fatores de normalização para cada amostra com base na média geométrica dos genes testados, assumindo valores de estabilidade (M) abaixo de 1,5 como ponto de corte. Através da comparação aos pares das quantidades relativas de expressão de cada gene analisado de todas as possíveis combinações gênicas deste gene pareado contra os demais. É possível definir quantos genes de referência são necessários para validar o experimento de qPCR das amostras analisadas, como proposto por Vandesompele e colaboradores (2002).

Por sua vez, o NormFinder é capaz de realizar uma estimativa da variação da expressão intra e intergrupos, como também combina as duas para calcular valores de estabilidade – *stability value* (Sv), classificando os candidatos pelas diferenças das condições experimentais (Andersen *et al.*, 2004).

Após a seleção dos genes de referência, para a normalização da reação de qPCR, calculou-se a variação de expressão relativa pelo modelo proposto por Pfaffl e colaboradores (2002) com o auxílio do programa *Relative Expression Software Tool* (REST-2009) (Pfaffl *et al.*, 2002). Este programa permite uma estimativa de expressão gênica com nível de significância entre os genes alvo e genes de referência selecionados, com base no método $\Delta\Delta C_q$; porém, corrigindo as eficiências dos diferentes *primers*.

5.Resultados

5.1 PREVALÊNCIA DE ESTs CLOROPLASTIDIAIS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

Um total de 41 sequências consenso (TC, *tentative consensus*) de cana-de-açúcar apresentou correspondência com genes cloroplastidiais no banco de ESTs – TIGR Gene Index, porém 57% dos TC's não apresentaram informações da biblioteca de origem, não sendo possível incluí-los nas análises. Os 15 TC's com identificação apresentaram-se distribuídos em diferentes bibliotecas de cDNA (~órgãos), mostrando a prevalência presumível dos genes identificados na planta. Observou-se maior ocorrência dos genes cloroplastidiais em folhas maduras ou etioladas, nas bibliotecas pSL (genes *psbH*, *psbD*, *psbZ*, *psbM*, *ndhC* e *atpH*), LV1 (gene *petA*), LR1 (gene *petG*), NR2 (gene *psaB*) e Sugarcane mature leaf tissue library (genes *psbK* e *rbcL*), e pouca prevalência em inflorescências e sementes, FL5 (genes *psbT* e *psbN*), raízes, RT2 (gene *atpI*) e epiderme lignificada do colmo, SB1 (genes *ndhI*) (**Figura 11A**).

Observou-se que 37% dos TC's identificados na busca *in silico* pertenciam à família *psb* (**Figura 11B**) codificantes para subunidades do fotossistema II, que é o complexo proteico responsável pela captação da luz solar e fotólise da água.

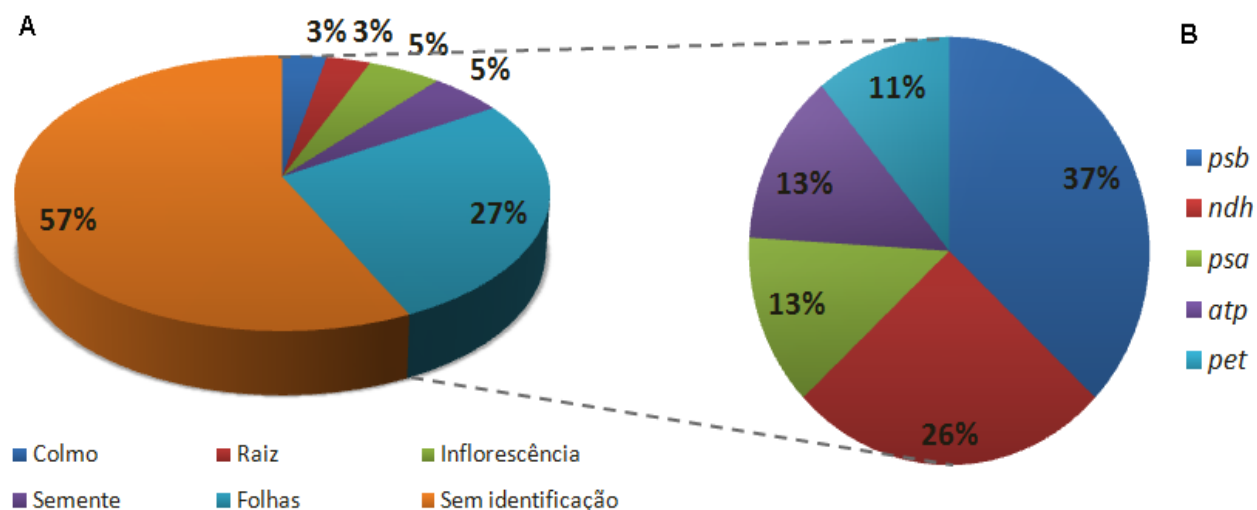


Figura 11. (A) Prevalência dos órgãos vegetais observados em bibliotecas de cDNA correspondentes a genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar disponível no banco de dados TIGR Gene Index de cana-de-açúcar. (B) Distribuição *in silico* das famílias gênicas identificadas no banco de dados TIGR Gene Index, sendo fotossistema I (*psa*), fotossistema II (*psb*), citocromo b_6f (*pet*), NADH desidrogenase (*ndh*) e ATP sintase (*atp*).

De acordo com os dados de expressão normalizados de cada TC nas bibliotecas identificadas (**Tabela 2**), encontrou-se prevalência do gene *psaB* na biblioteca NR2 a partir de um pool de tecidos (0,38%), seguido do gene *rbcL* (0,14%) e *psbM* (0,13%).

Tabela 2. Transcritos codificados por genes cloroplastidiais encontrados no banco de dados TIGR Gene Index por meio de BLASTn. São mostrados dados referentes ao tamanho do TC, a identificação no banco TIGR Gene Index, o gene correspondente, à similaridade (Sim) do alinhamento obtido, prevalência dos TC's nas bibliotecas, bibliotecas de origem e o órgão utilizado para construção da biblioteca.

Tamanho (pb)	TC*	Gene correspondente	Sim (%)	Prevalência (%)	Biblioteca	Órgão
2.661	TC148630	<i>psaB</i>	100	0,38	NR2	<i>pool</i> de órgãos
1.821	TC128385	<i>rbcL</i>	100	0,14	Folhas maduras	Folhas
939	TC133997	<i>psbM</i>	100	0,13	pSL	Folhas
584	TC152448	<i>psbZ</i>	100	0,13	pSL	Folhas
673	TC132114	<i>ndhI</i>	100	0,1	SB1	Epiderme lignificada do colmo
835	TC150955	<i>atpH</i>	100	0,04	pSL	Folhas
1.162	TC128448	<i>ndhC</i>	97	0,04	LR1 e pSL	Folhas
963	TC112716	<i>petA</i>	98	0,04	LV1	Folhas etioladas
2.640	TC143836	<i>psbD</i>	100	0,04	pSL	Folhas
411	TC151639	<i>psbH</i>	100	0,04	pSL	Folhas
813	TC152533	<i>psbK</i>	100	0,03	Folhas maduras	Folhas
744	TC112891	<i>atpI</i>	100	0,01	RT2	Raiz
620	TC153893	<i>petG</i>	100	0,01	LR1	Folhas imaturas
911	TC153582	<i>psbN</i>	100	0,01	FL5	Inflorescência/ Semente
911	TC153582	<i>psbT</i>	100	0,01	FL5	Inflorescência/ Semente

* TC: *tentative consensus* – união de várias *reads* para formar um *contig*.

NR2: todas as bibliotecas; pSL: folhas após indução floral; SB1: epiderme lignificada do colmo; LR1: primórdio foliar; LV1: crescimento foliar *in vitro*; RT2: ápice radicular e 0,3 cm a partir do ápice radicular em plantas maduras; FL5: flor em diferentes estágios de desenvolvimento.

A partir desses dados seguiu-se com o desenho de *primers* a partir da sequência do gene correspondente do plastoma da cana-de-açúcar para análise de sua expressão por RT-qPCR.

5.1.1 Desenho de *primers*

A busca por perfil de expressão de ESTs do plastoma de cana-de-açúcar no banco de dados TIGR Gene Index mostrou que vários genes cloroplastidiais pertencentes às famílias *psa*, *psb*, *pet*, *ndh* e *atp*, além do gene *rbcL*, foram identificados por metodologias que se baseiam no sequenciamento de cDNA total. Assim, foi possível selecionar 15 TC's para desenho de *primers* específicos para amplificação de regiões respectivas aos genes *atpH*, *atpI*, *ndhC*, *ndhI*, *petA*, *petG*, *psaB*, *psbD*, *psbH*, *psbK*, *psbM*, *psbN*, *psbT*, *psbZ* e *rbcL*.

Foram adicionados à análise três genes (*psaA*, *psbA* e *ndhJ*) que, apesar de não terem apresentado informações da biblioteca de cDNA, sua identificação pode acrescentar informações acerca do funcionamento cloroplastidial a partir da análise de sua expressão diferencial por RT-qPCR. Os genes *atpI* e *ndhI* foram excluídos das análises por terem sido identificados apenas em bibliotecas de raiz e colmo, respectivamente. No total, 16 genes cloroplastidiais foram selecionados a partir da identificação no banco de dados SoGI Gene Index/TIGR para desenho dos iniciadores específicos visando análise de PCR em Tempo Real.

O desenho dos *primers* foi realizado no programa Primer3, com base nos parâmetros pré-estabelecidos. Contudo, as sequências nucleotídicas correspondentes aos transcritos dos genes *psbZ*, *petG*, *psbT* e *psbM* não atenderam aos parâmetros ajustados para seleção de *primers* eficientes para a qPCR, não sendo possível obter tais *primers* para esses genes. Dessa forma, conseguiu-se desenhar *primers* para apenas 12 genes (**Tabela 3**).

Tabela 3. *Primers* desenhados pelo programa Primer3 a partir de genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar. Posição do pareamento na sequência; sequência do *primerforward* e *reverse*, respectivamente; tamanho do *amplicon*; temperatura de anelamento (TM); possíveis interações entre os *primers* (NetPrimer).

Gene	Posição	Sequência (5' → 3')	Amplicon (pb)	TM (°C)	Interações	ΔG (kcal/mol)
<i>psaA</i>	773	CAACCCCTTTTTCACCT	98	57,39	-	-
	870	ATCGCTCAACCATAGACCAC		57,61		-
<i>psaB</i>	453	AGGGGGTTGGTTACATCTAC	101	55,45	-	-
	553	CTCCGAAAAGTCCTGACA		54,55	Homodímeros	-3,92
<i>psbA</i>	840	AGTAGGGATCTGGTTCACTG	96	54,14	Homodímeros	-4,62
	935	CGACCTTGGCTATCAACTAC		54,99		- 4,9
<i>psbK</i>	41	CTGTTCTTTGTCCGACTAGC	84	55,19	Homodímeros	- 5,16
	124	CAGGCATAACATCCACGA		56,38		- 5,24
<i>psbD</i>	136	TTAGGGGGTTGGTTTACAGG	120	58,81	Heterodímeros	- 4,3
	255	ACTATTGGCAGGTGTGGA		54,72		
<i>psbH</i>	34	CCTAAGCCAAAACGGACT	102	55,38	Heterodímeros	- 3,94
	135	GACCCCCATAAAAGGAGTAG		55,26		
<i>psbN</i>	14	CTTTAGTCGCCATCTCCA	119	54,71	-	-
	132	TTAGTCCCCGTGTTCTTC		53,39		-
<i>petA</i>	217	GCAGTGCTTCCTGATACTGT	96	55,47	Grampo	- 1,5
	312	CAACCCTCCCTTTTACC		54,51	Homodímeros	- 5,89
<i>ndhJ</i>	314	GGAGAAGTGCCGATTTTC	111	54,36	-	-
	424	GCCAGCCTATCCAACCTT		55,29		
<i>ndhC</i>	102	TAGTGAAGGACCAGAGAAGC	146	54,63	Heterodímeros	- 3,94
	247	CCCAAGGGTAGAGAAAGACT		55,04		
<i>atpH</i>	5	AGTTGGTCAAGGTACTGCTG	138	55,40	Homodímeros	- 3,65
	142	GCCACAACCAGTCCATAA		55,20		
<i>rbcL</i>	556	GGTAGAGCGTGTTATGAGTG	141	53,36	Heterodímeros	- 5,74
	696	GGTTTCGGCTTGTGCTTT		58,85		

Os *primers* foram submetidos a alinhamento local (BLASTn) contra banco de dados público no NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), a fim de confirmar a especificidade dos *primers* obtidos.

As análises realizadas pelo NetPrimer revelaram que a maioria dos *primers* obtidos formam estruturas secundárias como dímeros de *primers* [complementação entre as bases no mesmo *primer*(homodímeros) ou entre os *primers*(heterodímeros)] e alguns com formação de grampo (dobramento do *primer*). Contudo, os valores de energia livre de Gibbs (ΔG) foram baixos, e provavelmente não ocasionariam problemas durante as análises de RT-qPCR (Rychlik, 1993).

5.2 ANÁLISE DO MATERIAL VEGETAL

5.2.1 Perfis fisiológicos do material vegetal

5.2.1.1 Potencial hídrico foliar (Ψ_{wf})

Observaram-se diferenças significativas no Ψ_{wf} em ambas as variedades estudadas, em relação ao seu controle (**Figura 12**). A variedade tolerante sob seca apresentou uma redução significativa de 37% do Ψ_{wf} em comparação com a variedade sensível. Essa redução mostra que a variedade tolerante, possivelmente, está acumulando mais soluto e osmoprotetores para proteção contra a dessecação e na tentativa de captar mais água do solo.

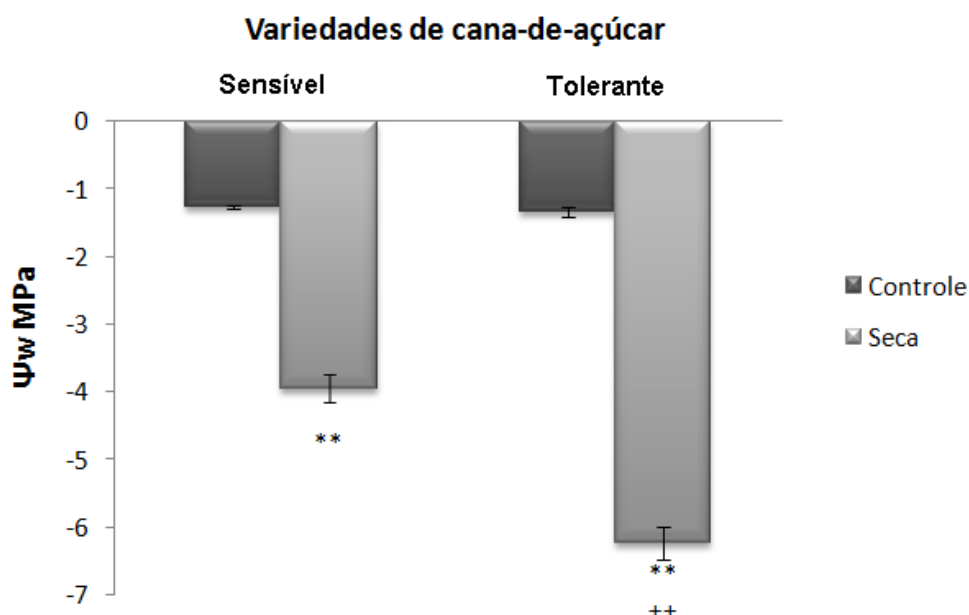


Figura 12. Valores médios do potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}) nas variedades de cana-de-açúcar tolerante e sensível à seca, cultivadas em casa-de-vegetação sob déficit hídrico por oito dias, com medidas ao meio-dia (12 h). * Comparação entre tratamentos (controle e seca). + Comparação entre variedades. ** diferença significativa ao nível de 5% pelo teste *Tukey*. ++ diferença significativa ao nível de 5% pelo teste *Tukey*. CV% = -5,19, DMS para colunas=0,2556 e DMS para linhas=0,2556.

5.2.1.2 Fotossíntese líquida (A), transpiração foliar (E) e concentração interna de CO₂ (Ci)

As plantas das variedades tolerante e sensível apresentaram reduções significativas na fotossíntese (A) em relação ao seu controle, de 96% e 94,5%, respectivamente (**Figura 13**). Porém, não se observou reduções significativas da fotossíntese no tratamento sob seca entre as variedades. A fotossíntese é bastante afetada pela redução de absorção de CO₂, neste experimento, ambas as variedades de cana-de-açúcar não conseguiram manter os níveis de fotossíntese líquida.

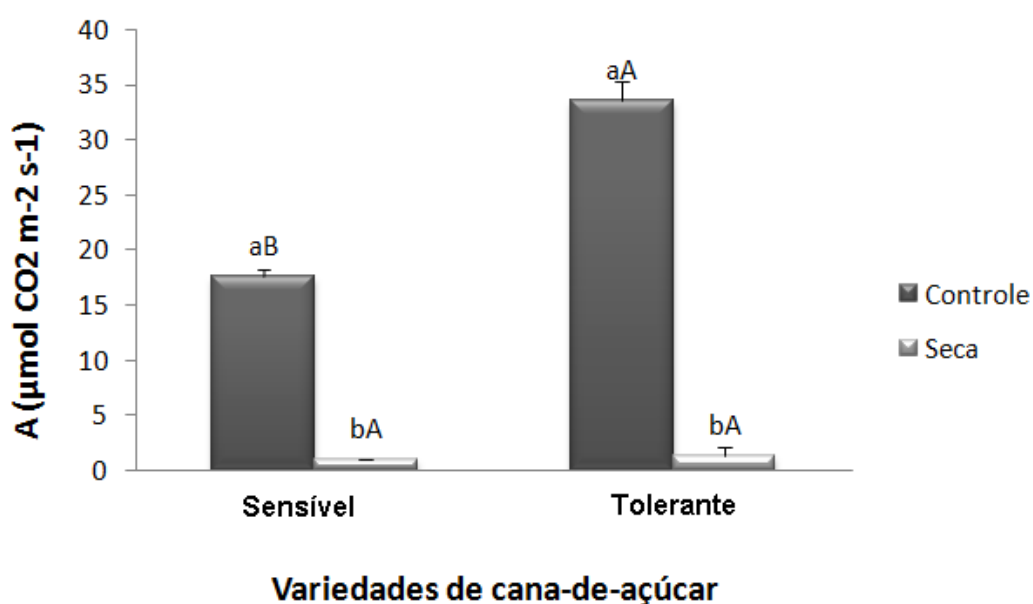


Figura 13. Valores médios da fotossíntese líquida (A) nas variedades de cana-de-açúcar tolerante e sensível à seca, cultivadas em casa-de-vegetação sob déficit hídrico por oito dias. Letras minúsculas comparam diferentes tratamentos dentro de uma mesma variedade. Letras maiúsculas comparam o mesmo tratamento entre variedades. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV% = 12,41, DMS para colunas=3,1251 e DMS para linhas=3,1251.

Para a transpiração foliar (E), houve reduções significativas de 99,4% e 92,4% em ambas as variedades de cana-de-açúcar, tolerante e sensível, respectivamente, em relação ao seu controle a quase zero (**Figura 14**). Essa alternativa de redução da transpiração evita a perda de água, evitando a dessecação, mostrando que ambas as variedades foram eficazes nesse parâmetro. Porém não houve diferenças em relação às variedades estudadas no tratamento seca.

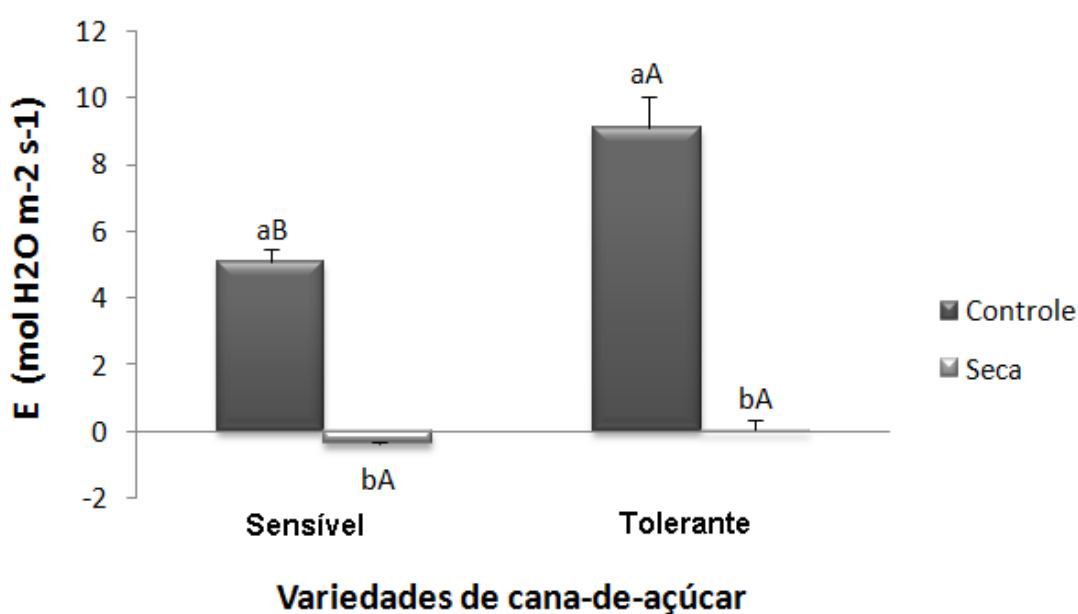


Figura 14. Valores médios da transpiração foliar (E) nas variedades de cana-de-açúcar tolerante e sensível à seca, cultivadas em casa-de-vegetação sob déficit hídrico por oito dias. Letras minúsculas comparam diferentes tratamentos dentro de uma mesma variedade. Letras maiúsculas comparam o mesmo tratamento entre variedades. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV% = 27,32, DMS para colunas = 1,7805 e DMS para linhas = 1,7805.

A variedade sensível submetida à seca apresentou redução na concentração interna de $\text{CO}_2(\text{Ci})$ de 59% em comparação com seu controle, porém não apresentou diferença significativa (**Figura 15**). Enquanto que o tratamento seca da variedade tolerante apresentou um aumento na concentração interna de CO_2 de 16% em relação ao seu controle. Esse discreto aumento na variedade tolerante mostra que, mesmo sob seca, essa variedade é capaz de acumular maior concentração de CO_2 interno em comparação com seu controle.

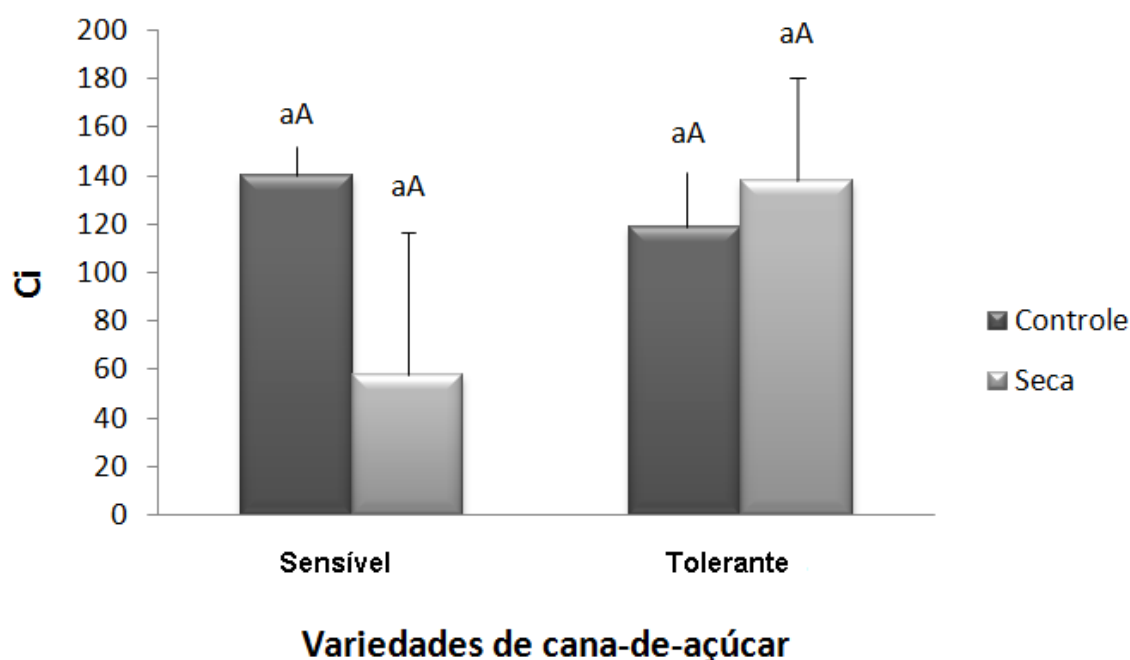


Figura 15. Valores médios da concentração interna de CO_2 (Ci) nas variedades de cana-de-açúcar tolerante e sensível à seca, cultivadas em casa-de-vegetação sob déficit hídrico por oito dias. Letras minúsculas comparam diferentes tratamentos dentro de uma mesma variedade. Letras maiúsculas comparam o mesmo tratamento entre variedades. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade. CV% = 58,29, DMS para colunas = 88,43574 e DMS para linhas = 88,43574.

5.2.2 Extração de RNA total

As análises de extração de RNA mostraram um padrão esperado de bandas no gel de agarose 1%, correspondendo ao RNA ribossomal 28S e 18S (**Figura 16**).

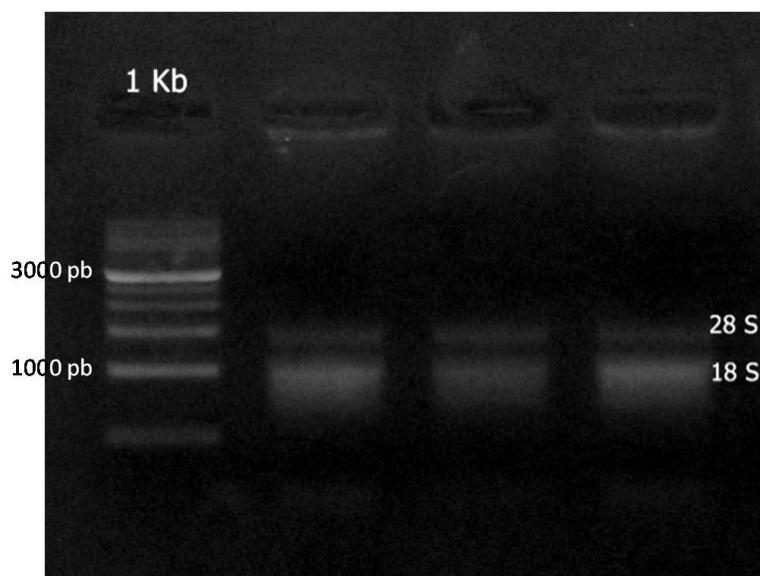


Figura 16. Gel de agarose 1% com o RNA total extraído. Utilizou-se o marcador de DNA 1 kb.

A quantificação do RNA dessas amostras (**Tabela 4**) revelou que, para ambas as variedades analisadas, foi extraída boa quantidade de RNA com grau de pureza adequada às análises de PCR em tempo real.

Tabela 4. Quantificação de RNA total de folhas de cana-de-açúcar das variedades tolerante e sensível à seca sob diferentes regimes hídricos, controle eseca por oito dias.

Tratamento	Variedade	Conc. Med. (ng/uL)*	Razão**
Controle	Tolerante	566,6	1,82
	Sensível	414,66	1,77
Seca	Tolerante	474,6	1,78
	Sensível	502,7	1,71

* Concentração média das triplicatas biológicas

** Razão A_{260}/A_{280}

5.2.3 Teste dos *primers* e síntese de cDNA

De forma a testar a integridade e qualidade dos *primers* sintetizados, realizou-se uma PCR convencional, utilizando DNA genômico e extra nuclear de folhas de cana-de-açúcar como molde (**Figura 17**).

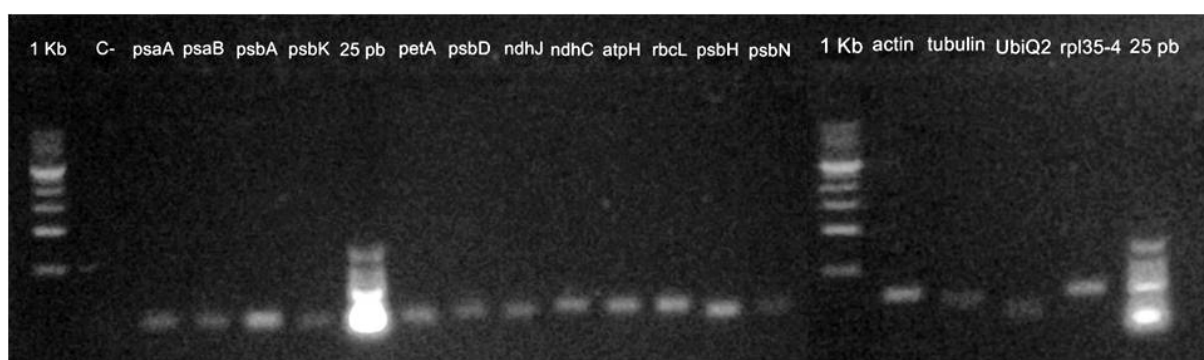


Figura 17. Gel de agarose 1% com o produto da PCR convencional do teste dos *primers* de cloroplasto de cana-de-açúcar, utilizando DNA genômico e extra nuclear como molde. Controle negativo (C-), marcador de DNA 25 pb e 1 Kb.

Assim, constatou-se que os *primers* desenhados para genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar são específicos, uma vez que amplificaram apenas uma banda com tamanho esperado, conforme a **Tabela 3**.

O teste dos *primers* a partir de um *pool* de cDNA das amostras controle revelou que estes são capazes de amplificar a partir do cDNA de cana-de-açúcar (**Figura 18**). A reação de PCR a partir dos cDNAs de cada tratamento e réplica biológica utilizando o *primer* para o gene da *Actina* (gene de referência, ver **Tabela 1**) mostrou que apenas em duas amostras foi possível verificar a presença de uma banda específica de 195 pb para o gene da *Actina* (**Figura 19**).

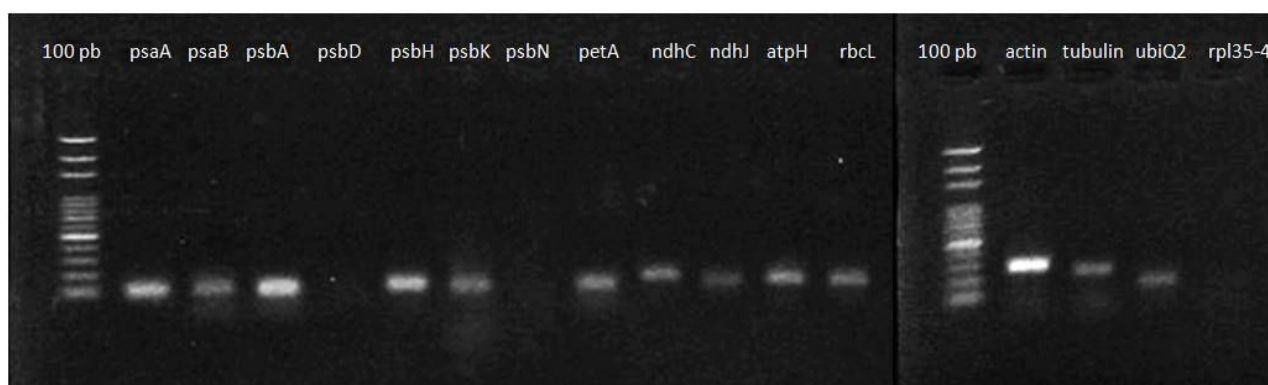


Figura 18. Gel de agarose 1% com o produto da PCR convencional do teste dos *primers* de cloroplasto de cana-de-açúcar, utilizando pool de cDNA como molde. Controle positivo DNA (C+), controle negativo (C-), marcador de DNA 100 pb.

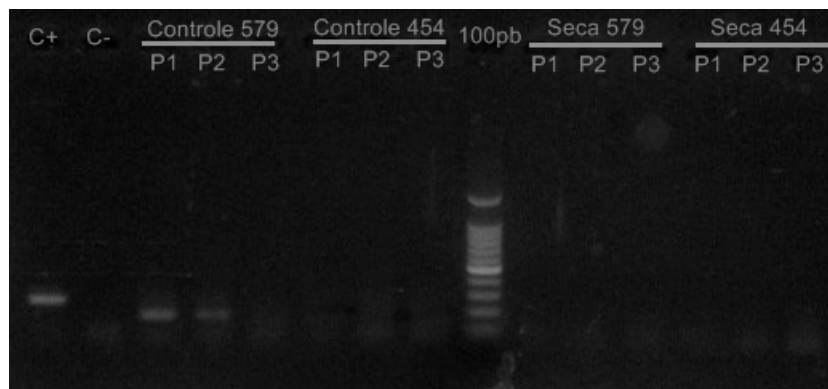


Figura 19. Gel de agarose 1% com o produto da PCR convencional do teste dos *primers* de cloroplasto de cana-de-açúcar, utilizando cDNA de cada tratamento como molde (Controle e Seca). Controle positivo DNA (C+), controle negativo (C-), marcador de DNA 100 pb. 579 (variedade tolerante), 454(variedade sensível), réplicas biológicas de cada tratamento (P1, P2 e P3).

5.3 ENSAIO DE qPCR

5.3.1 Otimização dos *primers*

A otimização dos *primers* revelou a concentração ideal para os ensaios de qPCR. Assim, estabeleceram-se as melhores concentrações de cada par de *primers* a fim de se obter o melhor desempenho de amplificação (menor Cq). A **Figura 20A** mostra a comparação entre as curvas de amplificação para o gene *psaA* com o gradiente de concentração do *primer*. Ao lado pode-se comparar a curva de *melting* (**Figura 20B**) obtida com a concentração de 0,5 μ M.

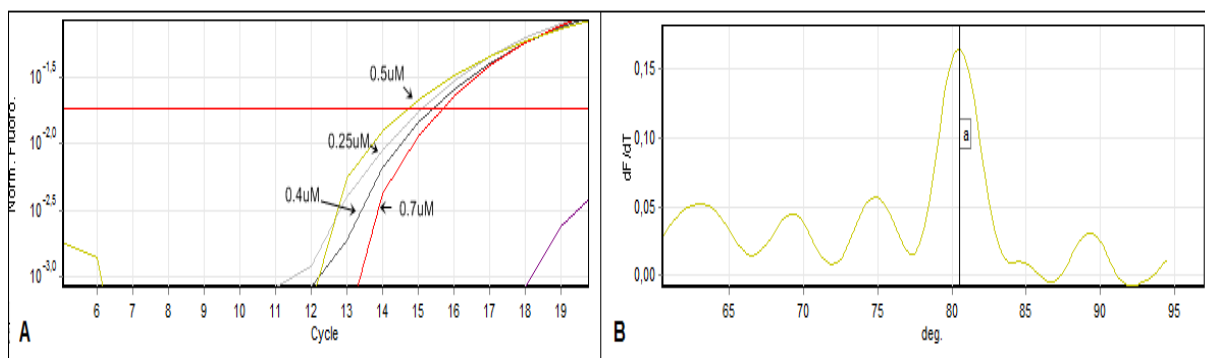


Figura 20. (A) Gráfico de amplificação do gene *psaA* obtido no Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) comparando as diferentes concentrações no ensaio de otimização dos *primers* de cloroplasto de cana-de-açúcar. (B) Curva de dissociação (*melting*) obtida a partir da amplificação do gene *psaA* de cana-de-açúcar na concentração de 0,5 μ M, mostrando apenas um pico de dissociação (aproximadamente 80°C), confirmando a amplificação específica do alvo.

Para cada *primer* foi estabelecida uma concentração ideal. Todos os genes de referência (*actina*, *rpl35-4*, *tubulina* e *UbiQ2*) apresentaram a concentração de 0,7 μ M como a mais adequada, assim como os genes *psbA* e *psbK*. Enquanto que os genes *psaA*, *psaB*, *psbD*, *atpH* e *rbcL* mostraram melhor amplificação na concentração de 0,5 μ M, já os genes *ndhJ*, *ndhC*, *psbH*, *psbN* e *petA*, apresentaram concentração de 0,4 μ M como a ideal. Essas concentrações foram utilizadas nas demais análises de qPCR.

5.6.2 Eficiência de amplificação

A eficiência de amplificação dos genes obtida pela construção de uma curva padrão a partir da diluição seriada das amostras de cDNA mostrou que os *primers* utilizados neste estudo apresentam eficiências semelhantes. A **Figura 21** mostra a curva padrão de amplificação do gene *psbK*; o *slope* (M), que está relacionado com a eficiência da amplificação, foi de -3,235, refletindo numa eficiência (Eff) de 104%.

O coeficiente de Pearson (R^2) foi de 0,97, indicando que houve precisão entre as triplicatas do ensaio.

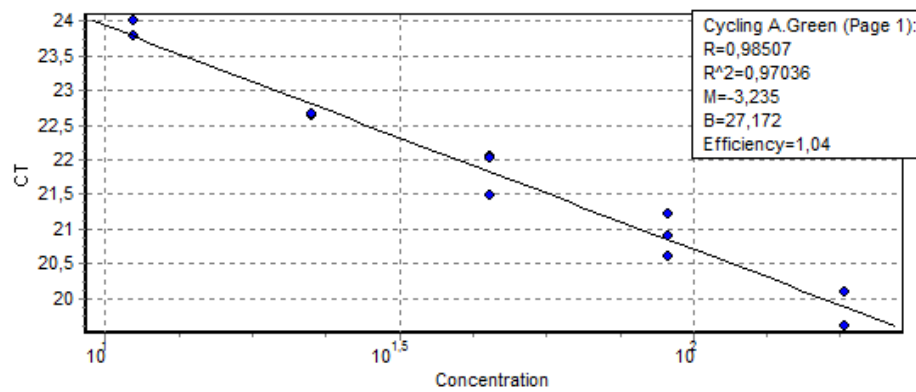


Figura 21. Curva padrão de amplificação do gene *psbK*.

As eficiências de amplificações de cada par de *primer* estão listadas na **Tabela 5**. Valores de eficiência entre 0,85 e 1,2 e coeficiente de Pearson (R^2) superior a 0,80, foram considerados satisfatórios.

Tabela 5. Eficiências de amplificação, *slope*(M) e R² apresentados pelos *primers*.

Componente	Gene	Eficiência (%)	R ²	Slope (M)
Fotossistema I	<i>psaA</i>	91	0,91705	-3,557
	<i>psaB</i>	120	0,93079	-2,918
Fotossistema II	<i>psbA</i>	115	0,9477	-3,012
	<i>psbK</i>	104	0,97036	-3,235
	<i>psbD</i>	96	0,96904	-3,418
	<i>psbH</i>	103	0,93411	-3,248
	<i>psbN</i>	107	0,93376	-3,155
Citocromo b6f	<i>petA</i>	114	0,93584	-3,024
NADH desidrogenase	<i>ndhJ</i>	94	0,90564	-3,466
	<i>ndhC</i>	96	0,94346	-3,423
ATP sintase	<i>atpH</i>	92	0,93437	-3,532
Subunidade maior da RuBisCO	<i>rbcL</i>	103	0,8518	-3,2426
Genes de referência	<i>Actina</i>	97	0,94344	-3,403
	<i>Tubulina</i>	99	0,95582	-3,349
	<i>rpl35-4</i>	87	0,9111	-3,678
	<i>UbiQ2</i>	92	0,87079	-3,528

5.6.3 Validação dos genes de referência

A estabilidade da expressão dos genes de referência foi determinada pelos programas estatísticos *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002) e *NormFinder* (Andersen *et al.*, 2004). O *geNorm* permite calcular a variação da média geométrica dos valores de expressão dos genes candidatos. Ao passo que o *NormFinder* é capaz de medir a variação de expressão, como também classificar os candidatos pelas diferenças das condições experimentais.

De acordo com o programa *NormFinder*, o gene que apresentou o menor valor de estabilidade de expressão gênica (Sv) foi o *rpl35-4* (Sv= 0,044), seguido do gene *UbiQ2*, com mesmo valor de Sv. Com isso, o programa mostrou que o melhor gene de referência é o *rpl35-4*, porém pode-se considerar ambos os genes como os mais estáveis nas amostras analisadas pelo *NormFinder* (**Tabela 6**).

Tabela 6. Valores de estabilidade (Sv) determinados pelo programa *NormFinder* para os candidatos a genes de referência testados.

Gene	Valor de estabilidade (Sv)
<i>rpl35-4</i>	0,044
<i>UbiQ2</i>	0,044
<i>Actina</i>	1,121
<i>Tubulina</i>	1,350

O programa geNorm calcula a estabilidade de expressão (M) para cada gene baseado na relação entre a expressão da média das variações (V) do valor da expressão, dos possíveis pares formados por esse gene e cada um dos candidatos no estudo, conseguindo corrigir pequenas variações nos genes de referência. Para tanto, assumiu-se valores de estabilidade (M) abaixo de 1,5 e coeficiente de variação (V) abaixo de 0,15 (Vandesompele *et al.*, 2002). O algoritmo do programa exclui o maior valor de M e torna a avaliar as médias de variação de expressão restantes, até encontrar valores ótimos de M ($M < 1,5$). Durante as análises no geNorm, constatou-se que o gene *Actina* apresentou o pior valor de estabilidade ($M = 2,6$). Assim, obteve-se a combinação *rpl35-4/UbiQ2* com o melhor valor de estabilidade (**Figura 22**).

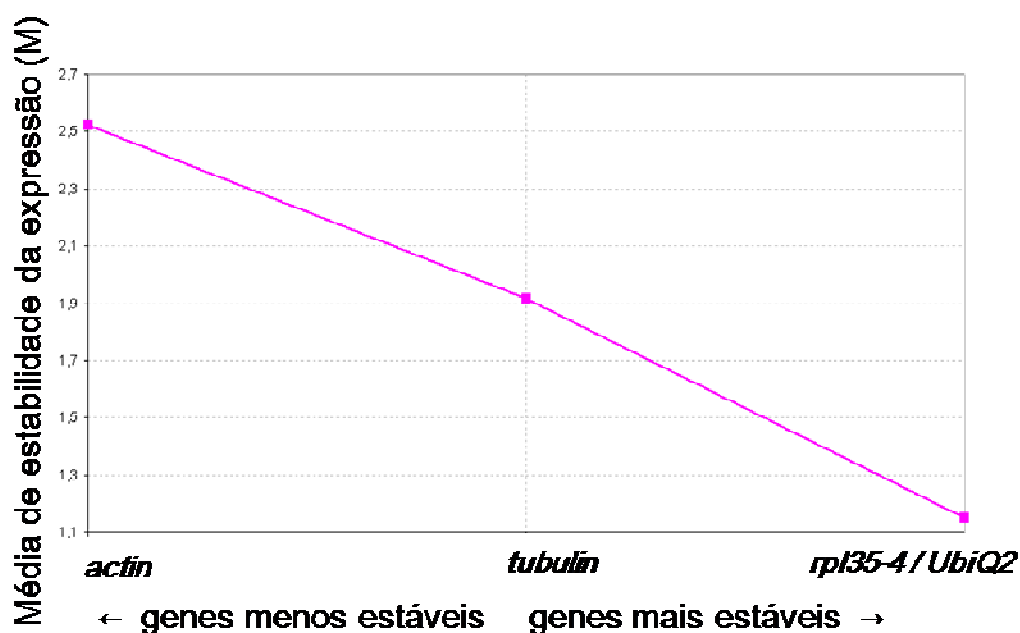


Figura 22. Gráfico obtido no programa geNorm relacionando a estabilidade gênica de cada gene analisado, com valor de estabilidade $M < 1,5$. É possível distinguir os genes mais estáveis (*rpl35-4/UbiQ2*) dos genes menos estáveis (*Tubulinae Actina*).

Ao se comparar os resultados obtidos por ambos os programas, NormFinder e geNorm, observou-se que o gene *rp/35-4* foi classificado como o gene mais estável, confirmando que este gene pode ser utilizado como gene de referência nas amostras de folha de cana-de-açúcar. Como o geNorm tende a selecionar o melhor par de genes pela sua similaridade e o NormFinder seleciona os genes com base na sua variação de expressão, constatou-se que essas duas análises foram capazes de agrupar os genes *rp/35-4* e *UbiQ2* como mais estáveis nas amostras analisadas. Dessa forma, considerou-se que o par proposto pelo geNorm (*rp/35-4/UbiQ2*) como o mais estável para o órgão estudado.

5.4 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA POR RT-qPCR

5.4.1 Comparação tolerante/sensível vs. respectivos controles

As análises de expressão relativa de genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar obtidos por RT-qPCR mostraram que as variedades analisadas apresentam um perfil de expressão cloroplastidial contrário para genes dos fotossistemas I e II. A **Tabela 7** apresenta os valores de expressão (VE) relativos dos genes de interesse gerados pelo programa estatístico REST 2009 (Pfaffl *et al.*, 2002) para cada variedade analisada em comparação com seu respectivo controle. Os valores entre 0 e 1 indicam a repressão do gene (Down-regulation), enquanto que valores acima de 1 indicam a indução do gene (Up-regulation), utilizando os genes de referência *rp/35-4* e *UbiQ2* para normalização dos resultados. O teste de hipótese considera valores

significativos aqueles com $p\text{-value} < 0,005$, valores acima não são significativos, considerando que não houve variação da expressão (No).

Tabela 7. Expressão relativa de genes cloroplastidiais de diferentes variedades de cana-de-açúcar submetidas à seca comparando com seus respectivos controles não tratados, em relação aos genes de referência *rpl35-4* e *UbiQ2*. Dados obtidos no programa REST 2009.

Gene	Variedade tolerante				Variedade sensível			
	VE	EP	$p\text{-value}$		VE	EP	$p\text{-value}$	
<i>psaA</i>	3.444,19	724,22 - 18.287,5	0,0000*	Up	1,10	0,20 - 4,93	0,8350	No
<i>psaB</i>	23,37	12,00 - 44,27	0,0000*	Up	0,16	0,08 - 0,28	0,0000*	Down
<i>psbA</i>	16,47	1,39 - 113,64	0,0010*	Up	0,07	0,02 - 0,24	0,0000*	Down
<i>psbK</i>	750,44	450,98 - 1.330,92	0,0000*	Up	0,63	0,26 - 1,07	0,0440*	Down
<i>psbD</i>	332,85	208,01 - 516,31	0,0000*	Up	0,20	0,11 - 0,41	0,0000*	Down
<i>psbH</i>	0,03	0,01 - 0,05	0,0000*	Down	1,08	0,48 - 2,398	0,7990	No
<i>psbN</i>	1,58	0,04 - 511,35	0,7730	No	0,73	0,35 - 1,47	0,1900	No
<i>petA</i>	0,03	0,01 - 0,09	0,0000*	Down	1,18	0,53 - 2,57	0,4870	No
<i>ndhJ</i>	1,93	0,10 - 194,87	0,5980	No	2,78	1,22 - 6,46	0,0020*	Up
<i>ndhC</i>	0,1	0,07 - 0,14	0,0000*	Down	2,28	1,24 - 4,20	0,0050*	Up
<i>atpH</i>	0,03	0,10 - 0,07	0,0000*	Down	0,58	0,29 - 1,07	0,0230*	Down
<i>rbcL</i>	0,65	0,04 - 14,76	0,6740	No	3,86	0,77 - 15,06	0,0130*	Up

VE: valores de expressão relativa; **EP:** erro padrão; **Up:** gene induzido; **Down:** gene reprimido; **No:** sem diferença significativa entre controle e tratado. *valores significativos a $\alpha=5\%$, pelo teste de hipótese P(H1) REST 2009.

A variedade tolerante apresentou uma indução nos genes representantes do fotossistema I (PSI), *psaA* e *psaB*, e do fotossistema II (PSII), *psbA*, *psbK* e *psbD*, em comparação com seu controle. Ao passo que o gene *psbH*, pertencente ao PSII, foi reprimido; assim como os genes pertencentes ao citocromo b_6f , *petA*, complexo

NADH desidrogenase, *ndhC*, e ATP sintase, *atpH*. A **Figura 23A** mostra o perfil de expressão dos genes cloroplastidiais avaliados nessa variedade.

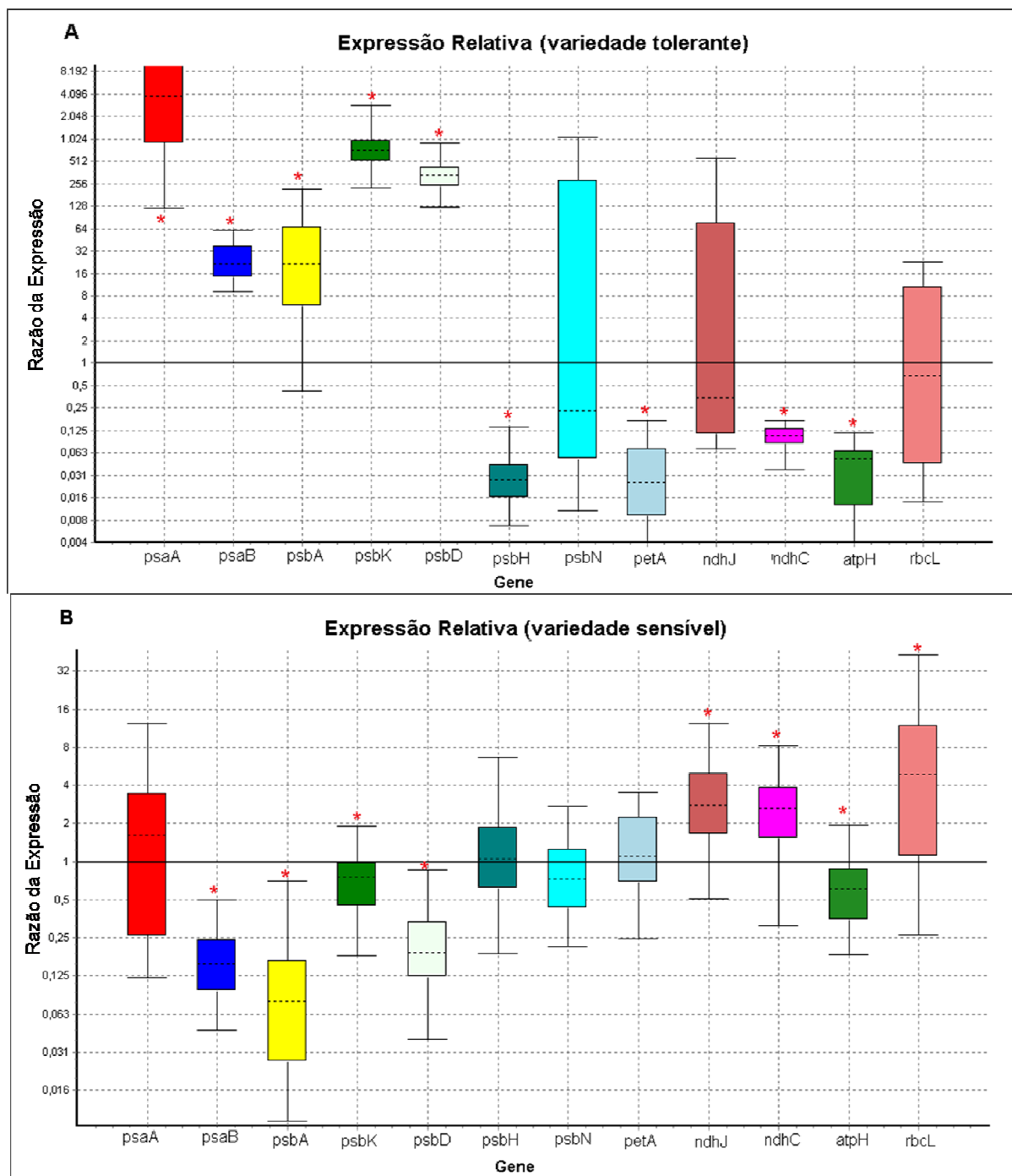


Figura 23. Representação gráfica da expressão relativa de genes cloroplastidiais da variedade tolerante(A) e sensível (B) de cana-de-açúcar em relação aos genes de referência *UbiQ2* e *rp/35-4*, submetida à seca por oito dias. As barras representam 50% dos valores observados; a linha tracejada representa a mediana das amostras; os limites extremos representam 25% das amostras superiores ($\top$) e 25% das amostras inferiores ($\perp$). * mostram valores de expressão com diferenças significativas a $p < 0,05$ pelo teste de hipóteses P (H1) REST 2009.

A variedade sensível apresentou uma indução dos genes estudados do complexo NADH desidrogenase, *ndhJ* e *ndhC*, além do gene *rbcL*, codificante da subunidade maior da proteína RuBisCO. Ao passo que alguns genes pertencentes ao PSII, *psbA*, *psbD* e *psbK*, foram reprimidos; assim como o gene para a ATP sintase, *atpH*, e o gene *psaB* do PSI (**Figura 23B**).

Sob déficit hídrico, a variedade tolerante apresentou uma indução dos genes do PSI, tendo um aumento de 3.000 vezes na expressão do gene *psaA* e de 23 vezes do *psaB*, em comparação com o grupo controle. Enquanto que a variedade sensível não foi capaz de manter níveis constantes desse fotossistema, apresentando uma repressão transcricional do gene *psaB* de 6 vezes, em comparação com seu controle.

O PSII apresentou uma variação no padrão de expressão dos genes codificantes estudados em ambas as variedades. O gene *psbN* não apresentou alteração na sua transcrição nas variedades deste estudo, enquanto os genes *psbA* (VE=16,45), *psbK* (VE=750,44) e *psbD* (VE=332,85) foram induzidos na variedade tolerante. Esses mesmos genes mostraram-se reprimidos na variedade sensível sob seca, com valores de expressão de 0,073, 0,631 e 0,205, respectivamente. Curiosamente, apenas o gene *psbH* foi reprimido sob seca na variedade tolerante (VE=0,026), enquanto que sua expressão manteve-se constante na variedade sensível sob seca.

O gene *petA*, codificante de componente do citocromo b_6f , apresentou repressão de 38 vezes na variedade tolerante, enquanto que este mesmo gene não apresentou variação na variedade sensível.

O complexo NADH desidrogenase apresentou uma indução na variedade sensível, através da expressão de duas vezes dos genes *ndhC* e *ndhJ*. A variedade tolerante se comportou de forma inversa, onde apenas o gene *ndhC* foi reprimido cerca de 10 vezes em comparação com seu controle.

O gene *petH*, representante da ATP sintase, foi reprimido em ambas as variedades, tendo uma repressão de 31 vezes na variedade tolerante e de 1,7 vezes na variedade sensível.

5.4.2 Comparação variedade sensível vs. variedade tolerante

As análises de expressão relativa de genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar obtidos por RT-qPCR na comparação entre as amostras submetidas à seca das variedades analisadas (sensível e tolerante), utilizando os dados das amostras da variedade sensível como controle no programa REST 2009, confirmaram os resultados de expressão relativa obtidas em primeira análise. Há uma expressão preferencial de genes dos fotossistemas I e II na variedade tolerante (**Tabela 8**).

Tabela 8. Expressão relativa de genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar submetidas à seca comparando as variedades sensível e tolerante, em relação aos genes de referência *rpl35-4* e *UbiQ2*. Dados obtidos no programa REST 2009.

Gene	Sensível vs. Tolerante			
	VE	EP	p-value	
<i>psaA</i>	224,928	32,875 - 796,783	0,0000*	Up
<i>psaB</i>	3.333,84	2.506,903 - 4.820,706	0,0000*	Up
<i>psbA</i>	79,476	46,442 - 141,809	0,0000*	Up
<i>psbK</i>	906,097	533,618 - 1.389,860	0,0000*	Up
<i>psbD</i>	408,826	252,999 - 707,366	0,0000*	Up
<i>psbH</i>	2,536	1,184 - 5,688	0,0040*	Up
<i>psbN</i>	4,954	0,121 - 1.527,948	0,2300	No
<i>petA</i>	0,221	0,058 - 0,737	0,0020*	Down
<i>ndhJ</i>	2,857	0,143 - 298,259	0,3330	No
<i>ndhC</i>	0,839	0,543 - 1,203	0,3170	No
<i>atpH</i>	0,744	0,194 - 1,941	0,4440	No
<i>rbcL</i>	10,186	0,489 - 228,664	0,0350*	Up

VE: valores de expressão relativa; **EP:** erro padrão; **Up:** gene induzido; **Down:** gene reprimido; **No:** sem diferença significativa entre as amostras. *valores significativos a $\alpha=5\%$, pelo teste de hipótese P(H1) REST 2009.

A variedade tolerante, em comparação com a variedade sensível, apresentou uma indução nos genes representantes do fotossistema I (PSI), *psaA* (VE = 224) e *psaB* (VE = 3.333), e do fotossistema II (PSII), *psbA* (VE = 79), *psbK* (VE = 906), *psbD* (VE = 408) e *psbH* (VE = 2,3). Apenas o gene *psbN*, pertencente ao PSII, não apresentou variação da expressão. O gene *petA* representante do complexo citocromo b_6f foi inibido na variedade tolerante cerca de 4 vezes. Os genes do

complexo NADH desidrogenase, *ndhC* e *ndhJ*, assim como o gene *atpH* da ATP sintase, não apresentaram variação da expressão relativa em comparação com a variedade sensível. Nesta análise, o gene *rbcL*, codificante da subunidade maior da RuBisCO, foi induzido 10 vezes em comparação com a variedade sensível.

A **Figura 24** mostra o perfil de expressão dos genes cloroplastidiais avaliados na comparação entre as variedades.

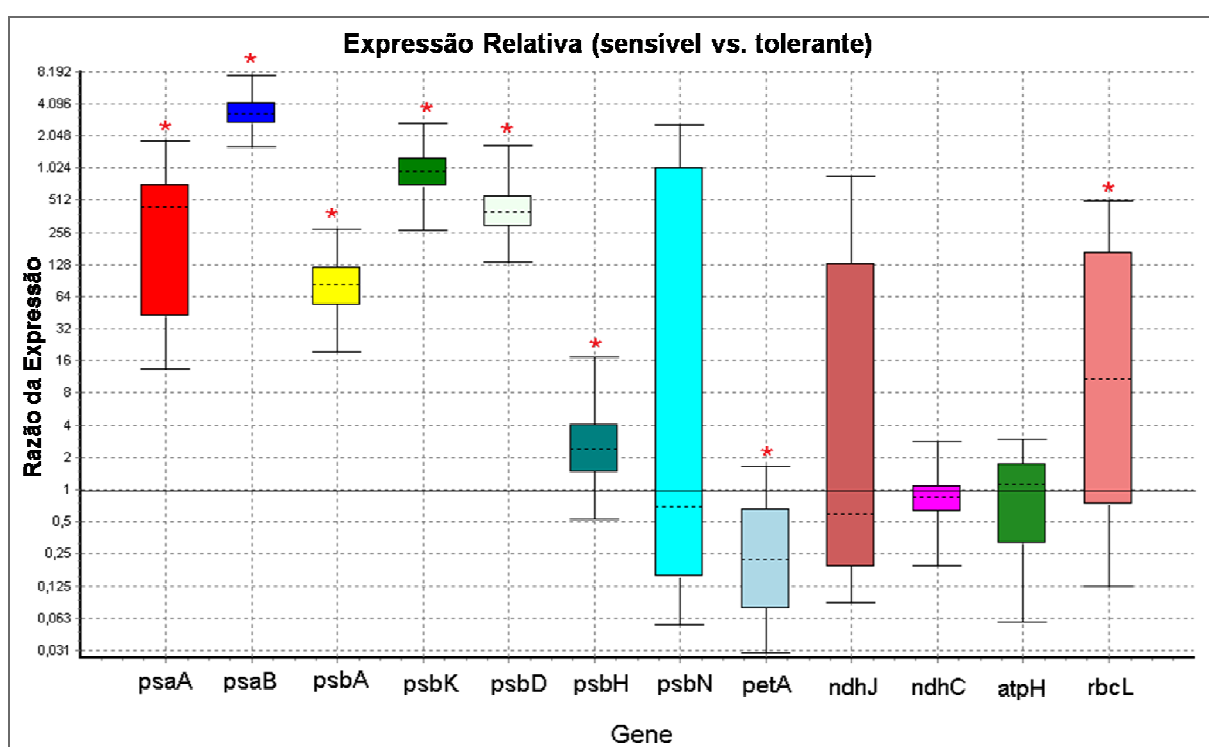


Figura 24. Representação gráfica da expressão relativa de genes cloroplastidiais da variedade tolerante de cana-de-açúcar comparando com a variedade sensível de cana-de-açúcar em relação aos genes de referência *UbiQ2* e *rp135-4*, submetida à seca por oito dias. As barras representam 50% dos valores observados; a linha tracejada representa a mediana das amostras; os limites extremos representam 25% das amostras superiores ($\top$) e 25% das amostras inferiores ($\perp$). * mostram valores de expressão com diferenças significativas a $p < 0,05$ pelo teste de hipóteses P (H1) REST 2009.

Assim, verificou-se que a variedade tolerante apresenta um perfil de transcrição preferencial de ativação de genes dos fotossistemas I e II e repressão de genes envolvidos em outros complexos da fotossíntese, como citocromo b_6f . De forma contrária, a variedade sensível à seca apresenta um perfil transcricional para ativação de genes codificantes de subunidades do citocromo b_6f e NADH desidrogenase, reprimindo genes codificantes de ambos fotossistemas. A indução do gene *rbcL* parece estar relacionada com a alta produtividade atribuída a essa variedade.

6. Discussão

6.1 IDENTIFICAÇÃO DE ESTs CLOROPLASTIDIAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR

A análise de prevalência de ESTs do plastoma de cana-de-açúcar no banco de dados TIGR Gene Index mostrou que vários genes cloroplastidiais são identificados por metodologias que se baseiam no sequenciamento de cDNA, como bibliotecas de EST e SAGE. A maior parte dos transcritos codificados por genes cloroplastidiais foi identificada em bibliotecas de folhas. Os dados de prevalência de transcritos em TC's, mostram que os genes cloroplastidiais são encontrados com facilidade em bibliotecas de cDNA, principalmente, quando se utiliza folha como órgão de estudo. Os mRNAs cloroplastidiais apresentam uma curta cauda poli-A (Rott *et al.*, 1998), permitindo sua eventual captura com *primers* oligo-dT utilizados em técnicas de expressão gênica, principalmente em tecidos fotossintéticos, devido ao elevado número de ploidia e cópia do genoma plastidial nas folhas (Calsa Jr. e Figueira, 2007a). Porém a falta de informações referentes aos TC's encontrados, biblioteca, condição biológica e estágio de desenvolvimento, dificultou uma abordagem mais ampla, envolvendo mais genes para serem testados em estresse por seca.

Devido ao maior número de TC's identificados como sendo pertencentes à família *psb* (fotossistema II), acredita-se que a prevalência de genes dessa família leva a um aumento na quantidade de tais complexos nas membranas dos tilacóides. Em *Deschampsia antarctica* (Poaceae), Lee e colaboradores (2014) identificaram uma indução de genes do PSII, mostrando que esse complexo proteico é bastante expresso em condições normais de desenvolvimento.

6.2 MATERIAL VEGETAL

6.2.1 Análises Fisiológicas

A constatação do estresse por seca das amostras analisadas mostrou que, embora as variedades tenham se comportado de forma semelhante nas variáveis fisiológicas analisadas, a variedade tolerante apresentou um maior número de respostas associadas à tolerância à seca em comparação ao seu controle, como redução do potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}). Já a variedade sensível foi considerada sensível à seca, em virtude de não conseguir ativar mecanismos eficientes para tolerar a seca, como redução da concentração de CO_2 interno (C_i) e potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}) (Santos *et al.*, 2013). Esses resultados confirmam estudos anteriores que apontam a variedade RB92579 como tolerante à seca e a variedade RB72454 como sensível à seca (RIDESA, 2010).

6.3 EXPRESSÃO RELATIVA POR RT-qPCR

6.3.1 Genes de referência de cana-de-açúcar

A validação dos genes de referência pelos programas estatísticos geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) e NormFinder (Andersen *et al.*, 2004), permitiu a seleção do gene *rpl35-4*, como gene referência, dentre os candidatos propostos. O gene *rpl35-4*, codificante de uma proteína ribossômica, apresentou menor variação quantitativa entre as amostras de cana-de-açúcar, quando analisado por ambos os

programas. Entretanto, de acordo com o geNorm, para o ensaio de expressão relativa deste estudo, é necessário utilizar a combinação dos genes *rpl35-4/UbiQ2* para validação do experimento. A utilização de combinações gênicas é utilizada para normalizar o valor de expressão através de múltiplos genes, podendo garantir uma maior confiabilidade dos resultados de expressão relativa apresentados (Huggett *et al.*, 2005).

6.3.2 Expressão relativa: tolerante/sensível vs. controles não estressados

6.3.2.1 Fotossistemas I e II

As análises de expressão relativa de genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar mostraram que os genes dos fotossistemas do cloroplasto de cana-de-açúcar apresentam perfis de expressão contrários nas variedades analisadas neste estudo. Pesquisas anteriores relataram a expressão diferencial de genes relacionados aos fotossistemas I e II em outros organismos como responsiva a fatores abióticos, como o tipo de luz incidente na planta (Pfannschmidt *et al.*, 1999; Dhingra *et al.*, 2006; Puthiyaveetil e Allen, 2008), corroborando com os dados de expressão gênica neste estudo sobre o estresse por déficit hídrico.

As proteínas D1 e D2, codificadas respectivamente pelos genes *psbA* e *psbD*, são os componentes centrais do complexo proteico do fotossistema II (PSII). Na variedade tolerante, a indução de 16 vezes do gene *psbA* e de 332 vezes do gene *psbD* sugere que o aumento na quantidade desse complexo na membrana dos tilacóides favorece uma maior capacidade de captar fótons e realizar a fotólise de

moléculas de água disponíveis, de forma a aumentar a eficiência no uso da água durante a seca. Esta expressão aumentada parece contribuir para o aumento do número de fotossistemas na membrana dos tilacóides e, com isso, aumentar a geração do gradiente de prótons entre o estroma e o lúmen durante o fluxo de elétrons (Mitchell, 1966), mesmo em condições de déficit hídrico. Além disso, sabe-se que a proteína D1 é degradada para proteger o restante do PSII contra danos oxidativos sob excesso de luz (Aro *et al.*, 1993), portanto a maior expressão de seus transcritos pode indicar que a planta está mais adaptada para situações de estresse.

Os genes *psbK*, *psbN* e *psbH* também codificam subunidades transmembranares do PSII, porém com baixo peso molecular. Na variedade tolerante apenas o gene *psbK* foi induzido cerca de 750 vezes. Porém o gene *psbH* apresentou uma repressão de 38 vezes em relação ao controle. Além disso, o gene *psbN* não apresentou variação significativa no tratamento seca. O perfil de expressão do PSII na variedade sensível mostra que há uma inibição dos genes *psbA*, *psbD* e *psbK* do PSII, de forma oposta ao encontrado na variedade tolerante. Isso pode estar correlacionado com a baixa eficiência fotossintética atribuída a essa variedade (Santos *et al.*, 2013). O gene *psbA* foi associado à tolerância a herbicidas (Oettmeier, 1999; Thiel e Varrelmann, 2014), correlacionando mutações pontuais aos diferentes níveis de tolerância. Prabu e colaboradores (2011), estudando o estresse por déficit hídrico em cana-de-açúcar, identificaram indução de transcritos codificantes de uma subunidade do PSII. Essa descoberta corrobora com este estudo de que a indução do PSII em cana-de-açúcar parece auxiliar na tolerância ao estresse por seca.

O PSII sofre danos dependendo da intensidade da luz recebida, porém possui um mecanismo de reparo eficiente e dinamicamente regulamentado; assim o PSII é inibido apenas quando a taxa de danos excede a taxa de reparo (Allakhverdiev *et al.*, 2005). Isto sugere que o aumento nos níveis dos transcritos do PSII auxilia a cana-de-açúcar a tolerar o estresse por seca, pela reposição e/ou aumento do número de fotossistemas na membrana do tilacóide.

Os genes *psaA* e *psaB* codificam, respectivamente, as apoproteínas A1 e A2 do fotossistema I (PSI). Da mesma forma ao perfil de expressão encontrado para o PSII, os genes do PSI apresentaram uma indução na variedade tolerante de 3000 vezes, *psaA*, e de 23 vezes, *psaB*. Enquanto que a variedade sensível mostrou uma repressão de 6 vezes do gene *psaB* e o gene *psaA* não apresentou variação da expressão.

Bray (2002), estudando a expressão de genes de *Arabidopsis thaliana* sob seca, identificou a indução de transcritos da subunidade II do PSI. Um estudo anterior do proteoma de cana-de-açúcar sob estresse por déficit hídrico (Ribeiro, 2010) mostrou que ocorre uma indução da subunidade N do PSI na variedade RB867515 (tolerante à seca). Esses resultados corroboram com os dados transcricionais deste estudo, indicando que a indução de genes e proteínas codificantes do PSI parece ser específica para a tolerância à seca.

A indução de genes do PSI e PSII na variedade tolerante de cana-de-açúcar pode estar relacionada com a maior eficiência no transporte de elétrons para a redução da molécula de NADP^+ a NADPH, cujo poder redutor é utilizado em etapas posteriores para síntese de trioses fosfatos (G3P) (Edwards e Walker, 1983).

6.3.2.2 Complexo citocromo b₆f

O citocromo b₆f é um componente central do transporte de elétrons, pois medeia a transferência de elétrons entre o PSII e PSI (Hasan *et al.*, 2013; Tikhonov, 2013b). Neste estudo avaliou-se a expressão do gene *petA*, responsável pela produção da apoproteína citocromo f. Na variedade tolerante, esse gene apresentou uma repressão de 38 vezes em relação ao grupo controle, enquanto que a variedade sensível não teve diferenças significativas de expressão entre os grupos controle e seca. Baniulis e colaboradores (2013) provaram que parte dos radicais superóxidos produzidos no cloroplasto são provenientes do citocromo b₆f, devido a uma maior ligação de uma semiquinona Q⁻ no citocromo b₆. Dessa forma, a repressão do gene *petA* pela variedade tolerante, pode estar envolvida na repressão desse complexo proteico minimizando a produção de radicais livres no cloroplasto, enquanto que a variedade sensível, aparentemente, não investe nessa estratégia, mantendo os níveis desse transcrito em relação ao seu controle.

6.3.2.3 Complexo NADH desidrogenase

O complexo NADH desidrogenase é composto por 15 subunidades, incluindo proteínas codificadas pelo núcleo e cloroplasto. Sua função está relacionada com a transferência cíclica de elétrons a partir do PSI e durante a clororespiração (redução de O₂ a H₂O por meio de oxidases membranares tilacoidais) (Suorsa *et al.*, 2009). Neste estudo, avaliou-se o perfil de expressão dos genes cloroplastidiais *ndhC*, codificante da subunidade 3, e *ndhJ*, codificante da subunidade J. Na variedade tolerante apenas o gene *ndhC* foi inibido 10 vezes em relação ao seu controle,

enquanto que na variedade sensível ambos os genes foram induzidos em relação ao seu controle, cerca de duas vezes.

A atividade do complexo NADH desidrogenase parece estar relacionada com a adaptação da maquinaria fotossintética a condições de estresses abióticos como calor, seca e alta luminosidade (Rumeau *et al.*, 2007; Martín e Sabater, 2010), porém evidenciamos uma inibição dos genes associados a esse complexo proteico na variedade tolerante. Darie e colaboradores (2006) mostraram que a maior quantidade de complexos NADH desidrogenase nos cloroplastos da bainha vascular de plantas C4 do que nos cloroplastos do mesofilo sugere que esse complexo poderia contribuir para a geração de ATP através do seu envolvimento no transporte de elétrons cíclico em torno do PSI. Estudos de inativação de genes cloroplastidiais do complexo NADH desidrogenase demonstraram que a perturbação em genes *ndh* causa uma desestabilização de todas as subunidades do complexo (Horvath *et al.*, 2000; Suorsa *et al.*, 2009). Além disso, a transferência cíclica de elétrons ou dependente de NAD(P)H desempenha um papel central no fornecimento de ATP necessária para acionar o mecanismo de concentração de CO₂ na fotossíntese C4 (Rumeau *et al.*, 2007). Em resposta à escassez de água, as plantas fecham os estômatos para limitar a perda de água por transpiração, diminuindo a concentração de CO₂ interno e resultando no aumento da fotorrespiração. Nestas condições, a necessidade de ATP a partir da fixação de CO₂ é aumentada (Rumeau *et al.*, 2007). Assim, sugere-se que a indução de genes *ndh* na variedade sensível pode estar relacionada à baixa concentração de CO₂ nessas plantas sob déficit hídrico, investindo na produção do complexo NADH para fornecer o ATP extra necessário para suportar o estresse hídrico. Por sua vez, a variedade tolerante, por ter níveis

normais de CO₂ interno não ativou esse mecanismo para uma possível síntese aumentada de ATP.

6.3.2.4 Complexo ATP sintase

ATP sintase é o complexo proteico responsável pela produção de energia eletroquímica, acoplando o processo de transferência de prótons para síntese de ATP através das membranas do tilacóide (Malik Ghulam *et al.*, 2012; Tikhonov, 2013a). Ambas as variedades estudadas apresentaram inibição do gene *atpH*, codificante da subunidade III/C do complexo CF₀ da ATP sintase, porém de forma mais acentuada na variedade tolerante (31 vezes), podendo levar a uma redução dos níveis de ATP. Prabu e colaboradores (2011) identificaram uma indução dos transcritos da cadeia B da ATP sintase de cana-de-açúcar sob seca. Da mesma forma, Ji e colaboradores (2012) estudando proteômica de arroz, identificaram uma indução dos níveis da subunidade β da ATP sintase, estando esta correlacionada com a tolerância ao estresse hídrico. Contraditoriamente, em cana-de-açúcar, os níveis do mRNA do gene *atpH* foram reprimidos em ambas as variedades.

A acidificação do lúmeno tilacóide ($\uparrow\Delta pH$) controla o transporte de elétrons no cloroplasto, de forma que a síntese de ATP ocorre apenas sob condições de acidificação moderada, uma vez que as baixas concentrações de ADP e Pi inibem a síntese de ATP (Tikhonov, 2013a). Assim, a acidificação pode estar associada à repressão da expressão de genes da ATP sintase em cana-de-açúcar, uma vez que não há ADP e Pi para a síntese de ATP.

6.3.2.5 Subunidade maior da RuBisCO (*rbcL*)

A RuBisCO, ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase, é a enzima responsável pela fixação do CO₂ na sua forma orgânica no ciclo de Calvin (Andersson, 2008). Essa enzima é codificada por dois genes, *rbcS*, codifica a subunidade menor no genoma nuclear, enquanto o gene *rbcL*, codifica a subunidade maior no genoma cloroplastidial (Suzuki e Makino, 2013). Apenas a variedade sensível induziu a expressão do gene *rbcL* sob seca. As plantas sob seca sofrem acidificação do estroma cloroplastidial causando inibição/degradação da RuBisCO (Lisar *et al.*, 2012). Eckardt e Pell (1995), estudando o efeito do ozônio na modificação da estrutura da RuBisCO, relataram que estresses ambientais podem causar degradação da RuBisCO, a qual é substituída por novas subunidades a fim de restabelecer a função fotossintética.

Possivelmente, a indução na variedade sensível pode estar relacionada à acidificação do estroma cloroplastidial que estimulou uma maior degradação da RuBisCO, sendo necessário investir numa maior produção dessa enzima para manter os níveis da RuBisCO. A variedade tolerante, que conseguiu acumular mais osmoprotetores, de acordo com os valores do Ψ_{wf} (Nepomuceno *et al.*, 1998) e manter CO₂ no interior das células (valores de C_i), foi capaz de manter os níveis de RuBisCO, não sendo necessário investir na transcrição de novos genes.

6.3.3 Expressão relativa: sensível vs. tolerante

Através da comparação entre as amostras submetidas à seca das variedades sensível e tolerante de cana-de-açúcar confirmamos a importância da expressão de genes associados aos fotossistemas I e II, os quais foram induzidos na variedade tolerante de cana-de-açúcar em comparação à variedade sensível. Essa indução pode estar relacionada com o aumento ou reposição dos fotossistemas na membrana do tilacóide, auxiliando a cana-de-açúcar a tolerar o estresse por seca. Contudo, a acumulação das proteínas traduzidas a partir dos genes *psaA* e *psaB* em arroz é regulada a nível traducional e pós-traducional (Chenet *et al.*, 1992).

Da mesma forma, a inibição do gene *petA*, codificante da proteína citocromo b_6f do complexo citocromo b_6f , nessa comparação corrobora com a hipótese de que a inibição de genes desse complexo proteico pode minimizar a produção de ROS no cloroplasto quando a cana-de-açúcar se encontra em estresse por seca (Bainulis *et al.*, 2013).

No entanto, a análise dos genes codificantes de subunidades do complexo NADH desidrogenase (*ndhC* e *ndhJ*) e da ATP sintase (*atpH*) não apresentaram diferenças na expressão relativa na comparação sensível x tolerante.

A indução dos genes *ndhC* e *ndhJ* (VE = 2,3 e VE = 2,8) na variedade sensível, em comparação com seu controle, aparentemente se assemelhou com a inibição que a variedade tolerante demonstrou em relação ao seu controle (*ndhC* VE = 0,1). Assim, é possível que a variedade sensível utilize uma rota alternativa de escape ao estresse por seca não eficiente.

O gene *atpH* se comportou de forma semelhante em ambas às variedades de cana-de-açúcar, não havendo diferenças na sua expressão. A inibição do gene

atpH, de 38 vezes, na tolerante e, de 1,7 vezes, na sensível, observada na comparação com os controles não estressados, parece se equiparar nessas variedades, sendo um mecanismo importante para superar o estresse.

Contraditoriamente, o gene *rbcL* foi induzido 10 vezes na tolerante em comparação com a sensível. Aparentemente, essa indução mostra que a variedade tolerante apresenta uma expressão aumentada desse gene em comparação com a variedade sensível, podendo estar relacionada com a alta produtividade atribuída a variedade tolerante. Assim, a indução que a variedade sensível apresentou durante a seca não se equiparou com a indução da tolerante em condições normais de desenvolvimento, uma vez que em relação ao seu controle não apresentou expressão diferenciada.

Kapoor e colaboradores (1994) estudando a expressão dos genes *psbA*, *psbD*, *psaA* e *rbcL* em arroz, constataram sua expressão é dependente da etapa de desenvolvimento e da luz, contribuindo para estabelecer níveis de equilíbrio dos genes transcritos de cloroplastos. Da mesma forma, a expressão dos genes *psbA* e *rbcL* também está condicionada a presença de luz em *Vigna aconitifolia* (Kelkar *et al.*, 1993). Assim, é necessário confirmar a expressão de genes a nível proteômico em cana-de-açúcar para confirmar o mecanismo plastidial de tolerância à seca.

6.3.4 Modelos esquemáticos da resposta cloroplastidial à seca

Com base nos resultados de expressão gênica obtidos foi possível traçar um modelo esquemático do mecanismo de resposta cloroplastidial da cana-de-açúcar a seca (**Figura 25A e B**). Conforme visto, os genes envolvidos na montagem do

fotossistema II (PSII) e fotossistema I (PSI) apresentam uma maior expressão durante a seca na variedade tolerante, indicando que essas plantas são capazes de induzir essa expressão, provavelmente, visando repor e/ou aumentar o número de fotossistemas na membrana dos tilacóides, os quais podem ser danificados em situações de intenso estresse. Essa expressão parece ser crucial na tolerância à seca, uma vez que as plantas tolerantes não induziram a transcrição de genes envolvidos nos demais complexos proteicos da cadeia transportadora de elétrons analisados (**Figura 25A**). Assim, a tolerância à seca parece estar relacionada com a indução de determinados genes codificantes dos fotossistemas, a qual ocorre em variedades tolerantes e não ocorre, ou ocorre menor nível de expressão, em variedades sensíveis de cana-de-açúcar.

fotossistemas, mas favorecem a transcrição de genes do complexo NADH desidrogenase e da RuBisCO, sugerindo a utilização de uma rota alternativa, para maximizar a produção de ATP utilizado no ciclo de Calvin e aumentar a fixação de CO₂ pela RuBisCO (**Figura 25B**).

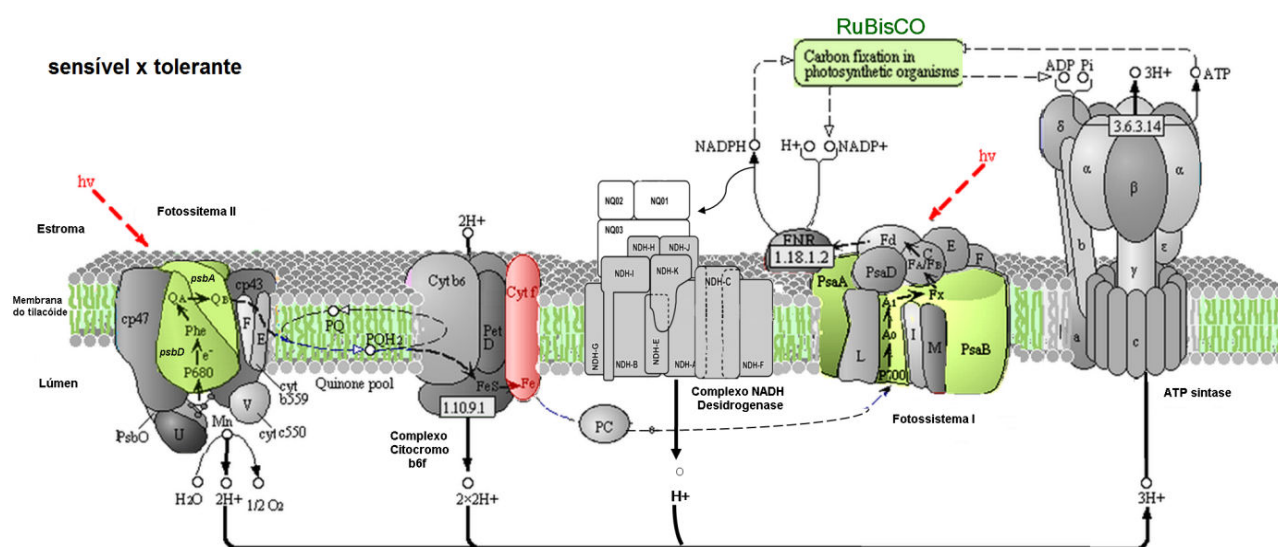


Figura 26. Modelo esquemático do mecanismo de resposta cloroplastidial comparando as variedades sensível e tolerante à seca de cana-de-açúcar submetidas a estresse por seca, evidenciando as subunidades proteicas codificadas por genes induzidos (em verde) e inibidos (em vermelho), os complexos proteicos em cinza não foram avaliados ou não apresentaram expressão diferenciada. Figura editada a partir do mapa de vias metabólicas do KEGG (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00195&show_description=show). Complexo NADH Desidrogenase inserido a partir do modelo proposto por Martín e Sabater (2010).

Assim, verificou-se que a variedade tolerante apresenta um perfil de transcrição preferencial de ativação de genes dos fotossistemas I e II e repressão de genes envolvidos em outros complexos da fotossíntese, como citocromo b_6f . De forma contrária, a variedade sensível à seca apresenta um perfil transcricional para ativação de genes codificantes de subunidades do citocromo b_6f e NADH desidrogenase, reprimindo genes codificantes de ambos fotossistemas. A indução do gene *rbcL* parece estar relacionada com a alta produtividade atribuída a essa variedade.

Muitas mudanças na expressão gênica ocorrem em resposta ao déficit hídrico. Estudos de regulação da expressão gênica de cloroplastos associam a presença de fatores de transcrição ao acúmulo de determinados mRNAs nessa organela. Raynaud e colaboradores (2007) observaram que diferentes fatores codificados pelo núcleo estão envolvidos na expressão seletiva de genes cloroplastidiais dependendo de variações fisiológicas. A sinalização plastídio-núcleo desempenha um papel importante na regulação dos processos cloroplastidiais e também na adaptação a estresses ambientais (Osakabe *et al.*, 2014). Assim, a indução/inibição da transcrição de genes cloroplastidiais também está condicionada à regulação nuclear para composição dos complexos proteicos da fotossíntese.

Portanto, estudos de níveis transcricionais de genes cloroplastidiais podem auxiliar no entendimento do mecanismo de ativação/inibição de genes cloroplastidiais frente a estresses abióticos. Além disso, é necessário investir em metodologias para comprovar a relação de genes cloroplastidiais com a resposta de tolerância à seca.

7. Conclusões

- A variedade de cana-de-açúcar tolerante apresenta um perfil de ativação transcricional de genes dos fotossistemas I e II podendo auxiliar na adaptação da cana-de-açúcar ao estresse por seca.
- A variedade de cana-de-açúcar sensível apresenta um perfil de inibição transcricional de genes codificantes de ambos os fotossistemas, dando preferência à ativação de genes codificantes de subunidades do complexo NADH desidrogenase e do gene *rbcL* (RuBisCO).
- Os principais genes de cloroplasto relacionados à tolerância à seca, *psaA*, *psaB*(PSI), *psbA*, *psbD*(PSII) e *petA* (citocromo b_6f), podem ser fortes candidatos a marcadores moleculares cloroplastidiais de tolerância à seca, visando auxiliar programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar.

8. Bibliografia

- Alfonsi RR, Pedro Júnior MJ, Brunini O and Barbieri V (1987) Condições climáticas para cana-de-açúcar. In: Paranhos SB (Coord.). Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Fundação Cargil, Campinas, v. 1. p.42-55.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-410.
- Allakhverdiev SI, Nishiyama Y, Takahashi S, Miyairi S, Suzuki I and Murata N (2005) Systematic analysis of the relation of electron transport and ATP synthesis to the photodamage and repair of Photosystem II in *Synechocystis*, Plant Physiol. 137:263-73.
- Alves HS. Sequenciamento e análise do genoma cloroplastidial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). 2005. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.
- Amalraj VA and Balasundaram N. On the taxonomy of the members of 'Saccharum complex' (2006). Genet Resour Crop Evol 53:35- 41.
- Andersen CL, Jensen JL and Orntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR Data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization. Applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res 64:5245-5250.
- Andersson I (2008) Catalysis and regulation in Rubisco. J Exp Bot 59:1555-68.
- Aro EM, Virgin I and Andersson B (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. Biochim Biophys Acta 1143:113-34.
- Azevedo RA, Carvalho RF, Cia MC and Gratão PL (2011) Sugarcane under pressure: an overview of biochemical and physiological studies of abiotic stress. Trop Plant Biol 4:42-51.
- Baniulis D, Hasan SS, Stofleth JT and Cramer WA (2013) Mechanism of enhanced superoxide production in the cytochrome b(6)f complex of oxygenic photosynthesis. Biochemistry 52:8975-83.
- Benko-Iseppon AM, Soares-Cavalcanti NM, Wanderley-Nogueira AC, Berlarmino LC, Silva RRM, Almeida PML, Brunelli KR, Kido LMH e Kido EA (2005) Genes associados a estresses bióticos e abióticos em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e outras angiospermas. In: Nogueira RJMC, Araújo EL, Willadino LG e Cavalcante UMT (Eds.) Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco p.350-359.
- Benko-Iseppon AM, Soares-Cavalcanti NM, Berlarmino LC, Bezerra Neto JP, Amorim LLB, Ferreira Neto JRC, Pandolfi V, Azevedo HMA, Silva RLO, Santos MG *et al.* (2011) Prospecção de genes de resistência à seca e à salinidade em plantas nativas e cultivadas. Revista Brasileira de Geografia Física 06:1112-1134.

- Bezerra IC (1998) Análise de RNA pela Técnica Northern Blot. In: Brasileiro ACM and Carneiro VTC (eds.) Manual de Transformação Genética de Plantas. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA CENARGEN, Brasília, pp 163-177.
- Bilgin DD, Zavala JA, Zhu J, Clough SJ, Ort DR and DeLucia EH (2010) Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell Environ* 33:1597-613.
- Borgonove CM and Silva-Filho MC (2010) Perda de genes e evolução do genoma organelar. <http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/CMBorgonai-200702-Resumo.pdf> (February 23, 2011).
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023. 2013. 96p. Brasília: Mapa/ACS. http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes%20-%20versao%20atualizada.pdf (December 3, 2013).
- Bray EA, Bailey-Serres J and Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stress In: Buchanan BB, Gruissem W and Jones RL (ed.) Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiology, pp1158-1203.
- Bray EA (2002) Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Ann Bot* 89:803-11.
- Bray EA (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 55:2331-41.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169-93.
- Calsa Jr T, Carraro DM, Benatti MR, Barbosa AC, Kitajima JP and Carrer H (2004) Structural features and transcript-editing analysis of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) chloroplast genome. *Curr Genet* 46:366–373.
- Calsa Jr T and Figueira A (2007a) Citrus plastid-related gene profiling based on expressed sequence tag analyses. *Genet Mol Biol* 30:848-56.
- Calsa Jr T and Figueira A (2007b) Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C4 metabolism and putative antisense transcripts. *Plant Mol Biol* 63:745-62.
- Carvalho LC, Bueno RCOF, Carvalho MM, Favoreto AL and Godoy AF (2013) Cana-de-açúcar e álcool combustível: histórico, sustentabilidade e segurança energética. *Enciclopédia Biosfera* 9:530-43.
- Carrer H (1998) Transformação de cloroplastos: quais as vantagens em se modificar esta organela? *Biotecnologia Cienc Desenvolv* 5:54-6.
- Chen SG, Cheng M, Chung K, Yu N and Chen M (1992) Expression of the rice chloroplast *psaA-psaB-rps14* gene cluster. *Plant Sci* 81:93-102.
- Chieppe Júnior, JB (2012) Tecnologia e fabricação do álcool. Inhumas: Universidade Federal de Santa Maria, 74pp.

- Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *AnaleBiochem* 162:156-159.
- Ciarmiello LF, Woodrow P, Fuggi A, Pontecorvo G and Carillo P (2011) Plant genes for abiotic stress. In: Shanker AK and Venkateswarlu B (eds.) *Abiotic stress in plants – mechanisms and adaptations*. Rijeka: In Tech, pp 283-308.
- CIB. Guia da Cana-de-açúcar: avanço científico beneficia o país. Conselho de Informações sobre Biotecnologia. 2009. 20p. http://www.cib.org.br/pdf/guia_cana.pdf (March 5, 2012).
- Clarke JL and Daniell H (2011) Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives. *Plant Mol Biology, Special Issue: Chloroplast Biotechnology and Evolution* 76:211-20.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, safra 2011/2012. 2011. 20p. Brasília: CONAB 2012. http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3cana_09.pdf (June 4, 2012).
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. 2013a. <http://www.conab.gov.br/conteudos/uploads/conabweb/uploadS/img/conteudos.php?a=1101&t=> (May 8, 2014).
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento. 2013b. 18p. Brasília: CONAB 2013a. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf (December 4, 2013).
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. 2013b. 16p. Brasília: CONAB, 2013c. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_12_20_10_56_08_bol_bole_cana_portugues_-_dez_2013_3o_lev_-_original.pdf (January 23, 2014).
- Daniell H, Kumar S and Dufourmantel N (2005) Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *TRENDS Biotechnol* 23:238-45.
- Daniels J and Roach BT. Taxonomy and evolution (1987) In: Heinz DJ (ed.) *Sugarcane improvement through breeding*. Amsterdam: Elsevier, pp 7-84.
- Darie CC, De Pascalis L, Mutschler B and Haehnel W (2006) Studies of the Ndh complex and photosystem II from mesophyll and bundle sheath chloroplasts of the C-4-type plant *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology* 163:800-8.
- Deconto JG (2008) Aquecimento global e a nova geografia da produção agrícola no Brasil. São Paulo: Embrapa. 82p.
- Dhingra A, Bies DH, Lehner KR and Folta KM (2006) Green light adjusts the plastid transcriptome during early photomorphogenic development. *Plant Physiol* 142:1256-66.
- Doyle JJ and Doyle JL (1991) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1:13-15.

- Edwards GE and Walker DA (1983) C3, C4: Mechanisms, and Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis. Blackwell, Oxford.
- Eckardt NA and Pell EJ (1995) Oxidative modification of RuBisCO from potato foliage in response to ozone. *Plant Physiol Biochem* 33:273-82.
- FAOSTAT, Food and Agricultural commodities production. Food and Agriculture Organization of the United Nations – Statistics Division (2014) <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Mar 06, 2014).
- Freeman WM, Walker SJ and Vrana KE (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* 26:112-25.
- Ginzinger DG (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30:503-12.
- Goes T and Marra R (2008) A expansão da cana-de-açúcar e sua sustentabilidade. EMBRAPA. Artigos Técnicos. <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2008/A%20expansao%20da%20cana-de-acucar%20e%20a%20sua%20sustentabilidade.pdf> (March 6, 2012).
- Gupta V, Raghuvanshi S, Gupta A, Saini N, Gaur A, Khan MS, Gupta RS, Singh J, Duttamajumder SK, Srivastava S *et al.* (2010) The water-deficit stress- and red-rot-related genes in sugarcane. *Funct Integr Genomics* 10:207-14.
- Hasan SS, Yamashita E and Cramer WA (2013) Transmembrane signaling and assembly of the cytochrome b6f-lipidic charge transfer complex. *Biochim Biophys Acta* 1827:1295-308.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G and Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology Nature* 11:1026-30.
- Horvath EM, Peter SO, Joet T, Rumeau D, Cournac L, Horvath GV, Kavanagh TA, Schafer C, Peltier G and Medgyesy P (2000) Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiol* 123:1337-50.
- Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M and Guo ZF (2012) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol Biol Rep* 39:969-87.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S and Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 4:279-84.
- Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, Bonnett GD, Maclean DJ and Manners JM (2004) Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression. *Plant Mol Biol Rep* 22:325-37.
- Ji K, Wang Y, Sun W, Lou Q, Mei H, Shen S and Chen H (2012) Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. *J Plant Physiol* 169:336-44.
- Kasuga M, Miura S, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2004) A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter

- improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol* 45:346-50.
- Kelkar NY, Maheshwari SC and Tyagi AK (1993) Light-dependent accumulation of mRNAs for chloroplast-encoded genes in *Vigna aconitifolia*. *Plant Sci* 88:55-60.
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT and Renaut J (2011) Plant proteome changes under abiotic stress – contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J Proteomics* 74:1301-22.
- Kuo WP, Jenssen T-K, Butte AJ, Ohno-Machado L and Kohane IS (2002) Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics* 18:405-12.
- Lee J, Kang Y, Shin SC, Park H and Lee H (2014) Combined analysis of the chloroplast genome and transcriptome of the antarctic vascular plant *Deschampsia Antarctica* Desv. *PLoS One* 9:e92501.
- Life Technologies Corporation (2012) Real-Time PCR Handbook. Life Technologies 66p.
- Lisar S, Motafakkerazad R, Hossain M and Rahman I (2012) Water Stress in plants causes, effects and responses. *Agricultural and Biological Sciences*, InTech, 14 pp.
- Lössl AG and Waheed MT (2011) Chloroplast-derived vaccines against human diseases: achievements, challenges and scopes. *Plant Biotechnol J*, Special Issue: Chloroplast Biotechnology and Evolution 9:527–39.
- Mackay IM, Mackay JF, Nissen MD and Sloots TP (2007) Real-time PCR: history and fluorogenic chemistries. In: Mackay IM (ed.) *Real-Time PCR in microbiology, from diagnosis to characterization*. Norfolk: Caister Academic Press, pp.1-40.
- Magro FJ, Takao G, Camargo PE and Takamatsu SY (2011) *Biometria em cana-de-açúcar*. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 18p.
- Malik Ghulam M, Zghidi-Abouzid O, Lambert E, Lerbs-Mache S and Merendino L (2012) Transcriptional organization of the large and the small ATP synthase operons, *atpI/H/F/A* and *atpB/E*, in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Mol Biol* 79:259-72.
- Martín M and Sabater B (2010) Plastid *ndh* genes in plant evolution. *Plant Physiol Biochem* 48:636-45.
- Menossi M, Silva-Filho MC, Vincentz M, Van-Sluys MA and Souza GM (2008) Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. *Int J Plant Genomics* 2008:458732.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S and Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 33:453-67.
- Mitchell P (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev* 41:445-502.

- Nepomuceno AL, Oosterhuis DM and Stewart JM (1998) Physiological responses of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethyleneglycol. *Envir ExperBotany* 40:29-41.
- Nielsen HB, Wernersson R and Knudsen S (2003) Design of oligonucleotides for microarrays and perspectives for design of multi-transcriptome arrays. *Nucleic Acids Res* 31:3491–96.
- Nogueira LAH (org.) (2008) Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. BNDES, Rio de Janeiro, 316 pp.
- NovaCana. ProÁlcool – Programa Brasileiro de Álcool. 2013. <http://www.biodieselbr.com/proalcool/pro-alcool/programa-etanol.htm> (May 8, 2014).
- Oettmeier W (1999) Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cell Mol Life Sci* 55:1255-77.
- Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K and Tran LS (2014) Response of plants to water stress. *Front Plant Sci* 13:1-8.
- Pacheco CM, Pestana-Calsa MC, Gozzo FC, Nogueira RJMC, Menossi M, Calsa T Jr (2013) Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. *J Proteome Res* 12:5681-95.
- Pelt-Verkuil E, van Belkum A and Hays JP (2008) Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer, 332 p.
- Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L (2002) Relative Expression Software Tool (REST[®]) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36.
- Pfannschmidt T, Nilsson A and Allen JF (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Plant Cell Biol* 397:625-8.
- Prabu G, Kavar PG, Pagariya MC and Prasad DT (2011). Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. *Plant Mol Biol Rep* 29:291-304.
- Puthiyaveetil S and Allen JF (2008) Transients in chloroplast gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun*. 368:871-4.
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K(2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol* 133:1755-67.
- Rached LZ. Barreiras à exportação do etanol brasileiro. 2011. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo – Faculdade de Economia e Administração. São Paulo. 2011.
- Raynaud C, Loiselay C, Wostrikoff K, Kuras R, Girard-Bascou J, Wollman FA and Choquet Y (2007) Evidence for regulatory function of nucleus-encoded factors on mRNA stabilization and translation in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci* 104:9093-98.

- Rensink WA and Buell CR (2005) Microarray expression profiling resources for plant genomics. *Trends Plant Sci* 10:603-09.
- Ribeiro ILAC. Proteômica de cana-de-açúcar em condição de estresse hídrico. 2010. 139f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
- RIDESA, Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (2010) Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro, Curitiba, 136p.
- Rodrigues FA, Laia ML and Zingaretti SM (2009) Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. *Plant Sci* 176: 286-302.
- Rodrigues LD. A cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de biocombustíveis: impactos ambientais e o zoneamento agroecológico como ferramenta para mitigação. 2010. 59 f. TCC (Especialização em Análise Ambiental) Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.
- Rott R, Liveanu V, Drager RG, Stern DB e Schuster G (1998) The sequence and structure of the 3'-untranslated regions of chloroplast transcripts are important determinants of mRNA accumulation and stability. *Plant Mol Biol* 36:307-314.
- Rozen S and Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press, pp 365-386.
- Rumeau D, Peltier G and Cournac L (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ* 30:1041-51.
- Rychlik W (1993). Selection of primers for polymerase chain reaction. In: White, BA (ed.). *Methods in molecular biology*. Totawa: Human Press, pp 31-40.
- Santos HRB, Pedrosa EMR, Nogueira RJMC, Rolim MM, Maranhão SRVL and Medeiros DB (2013) Crescimento de três variedades de cana-de-açúcar submetidas a estresse hídrico associado à *Meloidogyne incognita*. *Rev Bras Ciênc Agrar* 8:547-54.
- Saski C, Lee SB, Daniell H, Wood TC, Tomkis J, Kim HG and Jansen RK (2005) Complete chloroplast genome sequence of *Glycine max* and comparative analyses with other legume genomes. *Plant Mol Biol* 59:309-22.
- Scholander PF, Hammel HT, Hemmingsen EA and Bradstreet ED (1965) Hydrostatic pressure and osmotic potentials in leaves of mangroves and some other plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51:119-25.
- Schneeberger C, Speiser P, Kury F and Zeillinger R (1995) Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl* 4:234-8.

- Scortecci KC, Creste S, Calsa Jr. T, Mauro A, Landell MG, Figueira A e Benedito VA (2012) Challenges, Opportunities and Recent Advances in Sugarcane Breeding In: Plant Breeding.1 ed.Rijeka, Croatia : InTech - Open Access Publisher, p. 267-296.
- Shvaleva AL, Costa e Silva F, Breia E, Jouve J, Hausman JF, Almeida MH, Maroco JP, Rodrigues ML, Pereira JS and Chaves MM (2006) Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. Tree Physiol 26:239-48.
- Soares AMS and Machado OLT (2007) Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas 1:9-19.
- Suorsa M, Sirpiö S and Aro EM (2009) Towards characterization of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. Mol Plant 6:1127-40.
- Suzuki Y and Makino A (2013) Translational downregulation of RBCL is operative in the coordinated expression of Rubisco genes in senescent leaves in rice. J Exp Bot 64:1145-52.
- Taiz L and Zeiger E (2009) Fisiologia Vegetal. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 819p.
- Tangphatsornruang S, Sangsrakru D, Chanprasert J, Uthapaisanwong P, Yoocha T, Jomchai N and Tragoonrung S (2009) The chloroplast genome sequence of mungbean (*Vigna radiata*) determined by high-throughput pyrosequencing: structural organization and phylogenetic relationships. DNA Res 17:11-22.
- Telles MR, Saran LM and Unêda-Trevisolli SH (2011) Produção, propriedades e aplicações de bioplástico obtido a partir da cana-de-açúcar. Cienc & Tec 2:52-63.
- Thiel H and Varrelmann M (2014) Identification of a new PSII target site psbA mutation leading to D1 amino acid Leu218 Val exchange in the *Chenopodium album* D1 protein and comparison to cross-resistance profiles of known modifications at positions 251 and 264. Pest Manag Sci 70:278-85.
- Tikhonov AN (2013a) pH-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. Photosynth Res 116:511-34.
- Tikhonov AN (2013b) The cytochrome b(6)f complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways. Plant Physiol Biochem 1-21.
- Tangphatsornruang S, Sangsrakru D, Chanprasert J, Uthapaisanwong P, Yoocha T, Jomchai N and Tragoonrung S (2009) The Chloroplast Genome Sequence of Mungbean (*Vigna radiata*) Determined by High-throughput Pyrosequencing: Structural Organization and Phylogenetic Relationships. DNA Res 17:11-22.
- UNICA. União da Indústria de Cana-de-açúcar (2011), <http://www.unica.com.br/default.asp> (October 4, 2013).
- van Dillewijn C and Waltham M (1952) Botany of sugarcane. New York: Chronica Botanica 371p.
- Vandesompele J, de Preter K, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, de Paepe A and Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR

- data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:research0034.
- VanGuilder HD, Vrana KE and Freeman WM (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 44:619-26 Review.
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J and Zhu JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J* 45:523-39.
- Vettore AL, Silva FR, Kemper EL and Arruda P. (2001) The libraries that made SUCEST. *Genet Mol Biol* 24:1-4.
- Volkov RA, Panchuk II and Schöffl F (2003) Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. *J Exp Bot* 54:2343-49.
- Waclawovsky AJ, Sato PM, Lembke CG, Moore PH and Souza GM (2010) Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnol J* 8:263-76.
- Wang HH, Yin WB and Hu ZM (2009) Advances in chloroplast engineering. *J Genet Genomics* 36:387-98.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA and Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130-1.
- Wojciechowski MF, Lavin M and Sanderson MJ (2004) A phylogeny of legume (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *Am J Bot* 91:1846-62.
- Yuen T, Wurmbach E, Pfeffer RL, Ebersole BJ and Sealfon SC (2002) Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 30:47-8.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J and Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 12:e103.

9. Curriculum vitae (*Lattes*)

DADOS PESSOAIS

Nome: Taciana Conceição Manso

Filiação: Erasmo Luis Câmara Manso e Rosalba Maria da Conceição

Formação: Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado(UFPE)

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **MANSO, T. C.**, CALSA JUNIOR, T. Plastid genome-coded genes expression in silico analysis from sugarcane transcriptome In: IV Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2013, Bento Gonçalves / RS. **Anais do IV Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas**, 2013.
2. BEZERRA, J. M. N. A., **MANSO, T. C.**, BARBOSA NETO, A. G., PESTANA-CALSA, M. C., CALSA JUNIOR, T. Computational analysis of conserved regions in plant defensins In: XI Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq e 4th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2012, Recife-PE. **Anais da XI Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq e 4th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology**, 2012.

3. SOUZA, A. E. R., SOUZA, J. M., **MANSO, T. C.**, PESTANA-CALSA, M. C., CALSA JUNIOR, T. Isolamento do proteoma de parede celular de cana-de-açúcar para análise via 2D-PAGE/MS In: XIX Encontro de Genética do Nordeste, 2012, Juazeiro. **Anais do XIX Encontro de Genética do Nordeste**, 2012.
4. **MANSO, T. C.**, LIRA, N. P. V., CALSA JUNIOR, T. Modelagem *in silico* da proteína de choque térmico HSP82 de cana-de-açúcar In: XIX Encontro de Genética do Nordeste, 2012, Juazeiro. **Anais do XIX Encontro de Genética do Nordeste**, 2012.
5. **MANSO, T. C.**, LIRA, N. P. V., CALSA JUNIOR, T. Modelagem *in silico* da proteína de choque térmico Hsp82 em cana-de-açúcar In: VI Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos, 2012, Petrópolis/RJ. **Anais VI Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos**, 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **MANSO, T. C.**, CAVALCANTI, R. F. N., BARBOSA NETO, A. G., CALSA JUNIOR, T. Predição *in silico* da estrutura 3D da catalase de cana-de-açúcar In: I Congresso Internacional de Ciências Biológicas / II Congresso Nacional de Ciências Biológicas / VI Simpósio de Ciências Biológicas, 2013, Recife/PE. **Anais do I Congresso Internacional de Ciências Biológicas / II Congresso Nacional de Ciências Biológicas / VI Simpósio de Ciências Biológicas**, 2013.
2. BEZERRA, J. M. N. A., **MANSO, T. C.**, CALSA JUNIOR, T. Prospecção de genes de peptídeos antimicrobianos na espécie *Jatropha curcas* L. In: III Congresso de

Farmácia e Biomedicina da Faculdade ASCES, 2012, Caruaru. **Anais do III Congresso de Farmácia e Biomedicina da Faculdade ASCES**, 2012.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- | | |
|--------------------|--|
| 2013 - 2013 | Extensão universitária em: PCR em Tempo Real: Princípios Básicos e Aplicações.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, UFPE/Recife, Brasil |
| 2012 - 2012 | Curso de curta duração em: Análise da expressão gênica pela técnica de qPCR.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, XIX Engene/Juazeiro, Brasil |
| 2012 - 2012 | Curso de curta duração em: Recursos web aplicados ao estudo de sistema biológicos.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, XIX Engene/Juazeiro, Brasil |
| 2012 - 2012 | Curso de curta duração em: Mini-Curso Teórico Dinâmica Molecular.
Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Petrópolis, Brasil |
| 2012 - 2012 | Curso de curta duração em: Dinâmica Molecular Básica.
Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Petrópolis, Brasil |
| 2012 - 2012 | Curso de curta duração em: Predição de Estruturas de Proteínas.
Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Petrópolis, Brasil |