

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Clébia Maria Alves de Almeida

**ANÁLISES FISIOLÓGICAS E AVALIAÇÕES
MOLECULARES EM CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA
AO DÉFICIT HÍDRICO**

Recife
2012

Clébia Maria Alves de Almeida

**ANÁLISES FISIOLÓGICAS E AVALIAÇÕES
MOLECULARES EM CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA
AO DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva

Recife
2012

Almeida, Clébia Maria Alves de

Análises fisiológicas e avaliações moleculares em cana-de-açúcar em resposta ao déficit hídrico/ Clébia Maria Alves de Almeida. – Recife: O Autor, 2012.

80 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Márcia Vanusa da Silva

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas.
Biotecnologia, 2012.**

Inclui bibliografia

- 1. *Saccharum officinarum* 2. Melhoramento genético 3.
Fisiologia das plantas I. Correia, Maria Tereza dos Santos II.
Silva, Márcia Vanusa III. Título.**

584.92

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-132

Clébia Maria Alves de Almeida

**ANÁLISES FISIOLÓGICAS E AVALIAÇÕES MOLECULARES EM
CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO**

Tese de doutorado à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA:

Maria Tereza dos Santos Correia (Orientadora)
Profa Dra. Departamento de Bioquímica – UFPE

Maria Elizabeth Cavalcante Chaves
Profa. Dra. Departamento de Bioquímica – UFPE

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Departamento de Bioquímica – UFPE

Dr. Giovani Greigh Brito
Embrapa Arroz e Feijão – Embrapa

Profa. Dra. Marcia Vanusa da Silva
Departamento de Bioquímica – UFPE

Recife, 14 de fevereiro de 2012.

Aos meus pais e irmãos, por quem tenho grande admiração e gratidão pelo apoio irrestrito e oportunidades que na vida me proporcionaram.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus!

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, fica expresso aqui a minha gratidão, especialmente:

À Professora Tereza Correia, pela orientação, pelo aprendizado e apoio em todos os momentos necessários.

À Professora Márcia Vanusa, pela confiança, pela oportunidade na concretização de mais um projeto, amizade e aprendizado constante.

À Virginia Donato, pela oportunidade em trabalhar com a cultura da cana-de-açúcar, por este projeto, pelos ensinamentos, pela amizade, apoio e convívio ao longo desses anos.

Aos meus colegas de classe, pela rica troca de experiências.

Ao Dr. Giovani Brito, pesquisador da Embrapa, pela co-orientação, pela atenção dispensada e contribuições nas análises fisiológicas.

Aos amigos Alexandre, Isabel Renata, Adriana e Daniel, pela ajuda nos momentos mais difíceis e mais divertidos também. Pela convivência e disponibilidade em todas as horas.

Ao Túlio Diego, pela preciosa e inestimável colaboração nas análises proteômicas, amizade e dedicação.

À Carolina Malafaia, pelo apoio na condução dos experimentos e preciosa ajuda na editoração de figuras e textos, pela amizade e convívio.

Ao amigo José de Paula, pelas inúmeras vezes em que se empenhou em me ajudar nas atividades pertinentes a esta tese.

Aos responsáveis pelo Laboratório de Genoma (IPA), que possibilitou a realização desse e outros projetos ao longo da minha vida acadêmica.

Ao Eric Xavier (IPA) e à Estação Experimental de Carpina (UFRPE), pelo fornecimento das variedades de cana e atenção dispensada.

À todos os colegas do Laboratório de Genoma, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Ao Fernando (IPA), pela imensa ajuda e dedicação nos trabalhos na casa de vegetação.

À Facepe e a Embrapa (Programa Macro 3), pelo apoio financeiro que viabilizou a realização desse projeto.

À secretária da Pós-Graduação, Adenilda Lima, pela atenção e colaboração dispensada.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho.

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) tem considerável importância para a economia do Brasil, sobretudo para a região Nordeste. Dos fatores ambientais que limitam a produtividade dessa cultura, o déficit hídrico é considerado um dos mais importantes. A descoberta de proteínas que respondem ao déficit hídrico pode ser importante para os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar, uma vez que estas proteínas podem aumentar a tolerância a esse tipo de estresse. Dessa forma, o objetivo geral deste projeto foi comparar as variedades RB 72910, RB 931011 e RB 867515 submetidas a estresse hídrico utilizando uma abordagem proteômica. Inicialmente a variedade, não comercial, RB 72910 foi utilizada na construção de uma biblioteca de cDNA por meio da técnica de hibridização subtrativa por supressão (SSH) com o objetivo de isolar genes de defesa relacionados a estresses abiótico. Dos 122 clones obtidos, 40 clones mostraram similaridade com sequências depositadas em bancos de dados, 37 genes envolvidos em mecanismos de defesa, 24 foram similares a proteínas com função desconhecida e 21 clones foram associados ao desenvolvimento e manutenção celular. O gene que codifica para trealose-6-fosfato sintase, envolvido na resposta à seca, teve sua expressão confirmada por PCR quantitativo na variedade RB 72910. O padrão de expressão de proteínas foi avaliado por eletroforese bidimensional (2-DE). As plantas de cana foram submetidas à restrição de água durante 30 dias até atingir condições de déficit hídrico severo (20% de umidade gravitacional do solo). Sete proteínas tiveram sua expressão aumentada nas plantas tratadas em relação ao tratamento controle, enquanto três foram diminuídas. Para comparar o perfil de expressão de proteínas das três variedades, foram utilizadas as técnicas 2-DE e espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS/MS). Vinte plantas de cada variedade foram cultivadas em vasos (30 L) em casa de vegetação por três meses, sendo submetidas ao déficit hídrico por supressão da irrigação durante o terceiro mês. As análises revelaram mudanças significativas na intensidade de 53 *spots* de proteínas, as quais tiveram suas expressões aumentadas ou diminuídas em resposta à seca. Para a variedade RB 72910 foram seqüenciadas 4 proteínas que apresentaram aumento de expressão nas plantas submetidas ao déficit hídrico: ubiquitina, ácido indol-3- acético 34, NADH plastoquinona oxidoredutase e trealose-6-fosfato sintase. Para a variedade RB 931011 foram seqüenciadas 5 proteínas: aceto lactato sintase,

fatores responsivos ao etileno e trealose-6-fosfato sintase. Para a RB 867515 foram seqüenciadas 6 proteínas: proteína do fotossistema I *ycf4*, proteínas de senescência foliar, citocinina oxidase, NADH desidrogenase subunidade F, metionina amino peptidase e proteína de transporte ATPase Ca^{2+} . Em plantas, o acúmulo de *trealose* está relacionado com a tolerância à seca. Sendo assim a trealose-6-fosfato sintase constitui uma possível candidata para a transformação genética para obtenção de plantas mais tolerantes ao déficit hídrico ou para a sua utilização como biomarcador em cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*, estresse hídrico, eletroforese bidimensional

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum spp.*) have a considerable importance for the Brazil economy, especially for the Northeast region. Of the Environmental factors that limit the productivity of this crop, the drought and considered one of the most important. The discovery of proteins that respond to drought may be important for genetic sugarcane improvement, since these proteins may increase tolerance to such stress. Thus, the overall goal of this project was to compare the variety RB 72910, RB 931011 and RB 867515 subjected to water stress using a proteomics approach. Initially the non-commercial variety RB 72910 was used in the construction of a cDNA library by Supression Subtractive Hybridization (SSH) technique in order to isolate genes related to abiotic stress defense. Of the 122 clones obtained, 40 clones showed similarity to sequences deposited in databases, 37 genes involved in defense mechanisms, 24 were similar to proteins with unknown function and 21 clones were associated with the development and maintenance cell. The gene encoding trehalose-6-phosphate synthase, related in the response to drought, had its expression confirmed by quantitative RT-PCR in the RB 72910 variety. The protein expression pattern was assessed by two-dimensional electrophoresis (2-DE). The sugarcane plants were submitted to water restriction for 30 days until conditions of severe water deficit (20% of gravitational soil moisture). Seven proteins were shown to be increased in treated plants compared to control treatment, while three were decreased. Moreover, compared with susceptible variety to drought (RB 943365), the expression profile of RB 72910 was contrasting, indicating that the differentially expressed proteins may be related to water deficit. In order to compare the proteins expression profile in three varieties, 2-DE and mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) techniques were used. Twenty plants of each variety were grown in pots (30 L) in a greenhouse for three months, being subjected to water stress by suppression of irrigation during the third month. The analysis revealed significant changes in the intensity of 53 protein spots, which had increased or decreased their expression in response to drought. For variety RB 72910 4 sequenced proteins showed increased expression in plants submitted to drought: ubiquitin, indol-3-acetic acid 34, NADH-plastoquinone oxidoreductase and trehalose-6-phosphate synthase. For variety RB 931011 5 proteins were sequenced: chloroplast acetolactate synthase, factors ethylene-responsive factor transcription and trehalose-6-phosphate synthase. For the 867,515 RB were sequenced six proteins: photosystem I assembly protein ycf4, leaf senescence proteins, cytokinin oxidase, NADH dehydrogenase subunit F,

methionine aminopeptidase and Ca^{2+} transporting ATPase-like protein. In plants, the trehalose accumulation is related to drought tolerance. Thus trehalose-6-phosphate synthase is a possible candidate for the genetic transformation to obtain plants more tolerant to drought or to its use as a biomarker in sugarcane.

Keywords: *Saccharum officinarum*, water stress, bidimensional electrophoresis

LISTA DE FIGURAS

	Referencial Teórico	Pág
Figura 1:	Distribuição geográfica da cana-de-açúcar. O cultivo da cana-de-açúcar existe em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo e se estende ao Norte e ao Sul do Equador, seguindo a distribuição das linhas que delimitam a zona de crescimento das palmeiras e que caracterizam a zona tropical. Fonte: CIB, 2009.	22
Figura 2:	Sistema de numeração de folhas estabelecido por Kuijper. Folhas +1 +2 e +3 são folhas totalmente expandidas e fotossinteticamente ativas. Adaptado de Aline Melro Murad (2010).	23
Figura 3:	Fluxograma esquemático do desenvolvimento e análise da hibridização subtrativa supressiva (HSS).	30
Figura 4:	Fluxo experimental de um estudo proteômico. A mistura complexa de proteínas resultantes da extração de proteínas totais pode ser resolvida por meio de HPLC (<i>high performance liquid chromatography</i>) convencional ou do sistema MudPIT (<i>multidimensional protein identification technology</i>), e/ou ainda utilizando géis. Uma vez obtida uma mistura simples, esta é submetida ao sequenciamento para identificação das proteínas. Os espectros de massa/carga obtidos podem ainda ser utilizados na quantificação dos níveis de expressão de proteínas de interesse e na identificação de modificações pós-traducionais (MPT's). O sequenciamento MS/MS pode ainda ser destinado à identificação em larga escala de proteínas, previamente isoladas, que apresentam interações moleculares. (adaptado de Salvato; Carvalho, 2010).	35
 Capítulo I		
Figura 1:	Genes activated in the sugarcane plants treated with salicylic acid (SA). Genes were isolated by suppression subtractive hybridization, from sugarcane mRNAs, 24 hours after SA treatment.	51
Figura 2:	RT-PCR and Real-time PCR analysis. (A) Gene expression analysis of <i>SoTPS</i> . Pattern of RT-PCR expression of gene <i>SoT6P</i> analyzed in leaves of sugarcane plants under water stress. T0 - Control, T1 - 50% gravimetric soil moisture, T2 - 40% gravimetric soil moisture, T3 - 20% gravimetric soil moisture and T4 - 10% gravimetric soil moisture. EF-1 α , expression control. (B) Relative gene expression. Level of trehalose gene expression in RB 72910 sugarcane variety estimated by qPCR. Control (no stress), 100% gravimetric soil	52

moisture; Stress (severe stress), 10% gravimetric soil moisture.

- Figura 3:** Alignment of SoTPS sequences with trehalose of different organisms. A- Numbers on the right indicate the number of amino acids of the predicted protein. The sequences marked black dark gray and clear grey represent identical amino acids, 80% and 60% identity, respectively. *S. officinarum* (GenBank, accession no. DQ641513); *S. cerevisiae* (GenBank, accession no. X68214); *A. thaliana* (GenBank, accession no. NM100521); *G. biloba* (GenBank, accession no. AY884150) and *E. coli* (GenBank, accession no. X69160). B- Analysis of the phylogenetic tree of the SoT6P gene with trehalose of different organisms. The amino acid sequences were aligned with Clustal W and edited with Tree-explorer. 53

Capítulo II

- Figura 1:** Effect of water stress on relative water content (RWC) of sugarcane leaves A. Relative water content of RB 72910 C (control) and RB 72910 T (treated). B. Relative water content of RB 943365 C (control) and RB 943365 (treated). 62
- Figura 2:** Figure 2. Leaf water potential in sugarcane varieties under to water regimes at 0, 15 and 30 days after treatment establishment. A. RB 72910 C (control) and RB 72910 T (treated). B. RB 943365 C (control) and RB 943365 (treated). 62
- Figura 3:** Protein patterns in sugarcane leaves exposed to 30 days of drought stress. Proteins were extracted from leaves, separated by 2D-PAGE. In the first dimension (IEF), 250 µg of protein was loaded on a 13 cm IPG strip with a linear gradient of pH 3-10. The second dimension (SDS-PAGE), 12.5 % polyacrylamide gel was used. Proteins were visualized by Coomassie brilliant blue R-250. The positions of differentially expressed proteins are indicated by arrowhead.A. Control RB 72910; B. Drought-stressed RB 72910;C. Control RB 943365; D. Drought-stressed RB 943365. 64

Capítulo III

- Figura 1:** The 2-DE profiles for differential expressions of proteins in sugarcane leaves of control and water stress treatment. a - RB 72910; b - RB 931011; c - RB 867515. Proteins were extracted from leaves, separated by 2D-PAGE. In the first dimension (IEF), 250 µg of protein was loaded on a 13 cm IPG strip with a linear gradient of pH 3-10. The second dimension (SDS-PAGE), 12.5 % polyacrylamide gel was used. Proteins were visualized by Coomassie brilliant blue R- 74

250. The positions of differentially expressed proteins are indicated by arrowhead.

Figura 2: Comparison of up- and down-regulated spots in tolerant sugarcane varieties under water deficit condition. 75

LISTA DE TABELAS

	Pág
Capítulo I	
Tabela 1: Identification of salicylic acid-induced genes in sugarcane RB 72910, with similarity to known genes from <i>Sacharum officinarum</i> species.	51
Capítulo III	
Tabela 1: Proteins differentially expressed up regulated in stress treatment in sugarcane under water deficit identified by two-dimensional difference gel electrophoresis (2-DE) followed by mass spectrometry (MS).	76

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Graus Celcius

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CIB – Conselho de Informações sobre Biotecnologia

CTC - Centro de Tecnologia Canavieira

CV - Canavialis

Da – Dalton

2-DE - eletroforese bidimensional em gel

DNA - deoxyribonucleic acid

cDNA – DNA complementar

g.L-1- grama por Litro

HSP – Proteína de choque-térmico

HSS - hibridização subtrativa supressiva

IAC – Instituto Agronômico de Campinas

LEA – Abundantes na embriogênese tardia

MALDI-TOF - Analisador de tempo voo e ionização/desorção a laser assistida por matriz

MS – Espectrometria de massas

MudPIT - Multidimensional Protein Identification Technology

NaCl – cloreto de sódio

PCR - Polimerase Chain Reaction

PMGCA – Programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar

RB – República Brasileira

RIDESA - Rede Interuniversitaria para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro

RT-PCR - Reverse transcription PCR

qRT-PCR - Real-time reverse-transcription PCR

RNA - Ribonucleic acid

mRNA – RNA mensageiro

RH - Relative humidity

SA - salicylic acids

SSH - suppression subtractive hybridization

TRA - Teor relativo de água

UFAL – Universidade Federal de Alagoas

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS.....	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1. Cana-de-açúcar – Aspectos gerais.....	21
3.2. Variedades RB 72910, RB 867515, RB 931011 e RB 943365.....	23
3.3. Estresses abióticos.....	24
3.3.1. Déficit hídrico em cana-de-açúcar	26
3.4. Avaliações fisiológicas.....	26
3.4.1 Teor relativo de água (TRA) e Potencial hídrico foliar (Ψ_w)	
3.5. Técnicas moleculares para análise de identificação e expressão gênica....	27
3.5.1. Hibridização subtrativa por supressão (HSS).....	28
3.5.2. PCR em tempo real (qRT-PCR).....	30
3.5.3. Proteômica.....	31
4. REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO I: DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN SUGARCANE UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS.....	39
Abstract.....	41
Introduction.....	42
Material and Methods.....	43
Results and Discussion.....	45
Acknowledgments.....	49

References.....	50
CAPÍTULO II: DIFFERENTIAL PROTEIN EXPRESSION OF A DROUGHT-TOLERANT SUGARCANE VARIETY, RB72910, IN TO WATER DEFICIT RESPONSE.....	55
Abstract.....	56
Introduction.....	57
Material and Methods.....	57
Results and Discussion.....	60
Acknowledgments.....	64
References.....	65
CAPÍTULO III: IDENTIFICATION OF UP-REGULATED PROTEINS IN TOLERANT SUGARCANE PLANTS UNDER WATER DEFICIT.....	66
Abstract.....	67
Introduction.....	68
Material and Methods.....	69
Results and Discussion.....	70
Acknowledgments.....	72
References.....	76
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	79

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar tem sido relevante para a economia do Brasil desde o início do século 16. As primeiras plantas de cana foram trazidas da Ilha da Madeira e estabelecidas no Brasil por volta de 1515 (CHEAVEGATTI-GIANOTTO, 2011). Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com cerca de 8,4 milhões de hectares cultivados, os quais produziram aproximadamente 620 milhões de toneladas na safra 2010/11. O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional com 52,6%, seguido por Minas Gerais com 9,00% , Goiás com 7,97% , Paraná com 7,26% , Mato Grosso do Sul com 5,70% , Alagoas com 5,39% e Pernambuco com 3,85% (CONAB, 2011)..

Na região Nordeste do Brasil a cana-de-açúcar tem uma produção de pouco mais de 60 milhões de toneladas por safra, em 1,2 milhões de hectares de área cultivada nos Estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Bahia, Sergipe, Piauí e Maranhão. O Estado de Pernambuco, com 3,85% da produção nacional, é o segundo maior produtor da região nordeste, sendo superado apenas por Alagoas com 5,39% (CONAB, 2011). A produtividade, nessa região, se resume em dois aspectos: quando há déficit hídrico, apresenta 55 toneladas por hectare e quando não há déficit hídrico, 80 toneladas por hectare. A média da produção na safra 2010/11(de setembro a fevereiro) foi de 72 toneladas por hectare (IDEA 2011).

As plantas, seja em condições naturais ou cultivadas, estão expostas a ambientes desfavoráveis, o que resulta em algum grau de estresse. A prática agrícola no Nordeste é fortemente afetada pelo estresse hídrico, que é responsável por perdas significativas na produtividade em áreas do semi-árido, devido a distribuição irregular da chuva, alta evapotranspiração e altas temperaturas prevalentes. O déficit hídrico é um dos mais importantes fatores ambientais que limitam a produtividade da cana-de-açúcar (JANGPROMMA et al., 2010). A cana-de-açúcar é uma das culturas mais geneticamente complexas, devido ao alto número de poliplóides que provocam uma meiose irregular na fertilização cruzada, ocasionando problemas de esterilidade e dificuldades de cruzamentos e de autofecundação, o que impossibilita os estudos envolvendo a genética mendeliana e, conseqüentemente, a incorporação de características desejáveis, a exemplo da tolerância ao déficit hídrico. Uma das mais bem documentadas respostas fisiológico-

moleculares ao déficit hídrico em plantas é a habilidade de algumas espécies de ajustar osmoticamente suas células. Plantas superiores acumulam açúcares, ácidos orgânicos e íons no citosol para diminuir o potencial osmótico e, conseqüentemente, manter o potencial hídrico e o turgor de suas células próximo ao nível ótimo (ESTEVES; SUZUKI, 2008). Uma resposta comum das plantas aos estresses abióticos, tais como, seca, salinidade, baixas temperaturas, dentre outros é na acumulação de açúcares e outros solutos compatíveis, funcionando como osmoprotetores.

Os genes induzidos em resposta a estresses ambientais são divididos em dois grupos. O primeiro grupo inclui proteínas funcionais que, provavelmente, estão relacionadas à tolerância ao estresse: proteínas de canal envolvidas no movimento da água através das membranas, as enzimas necessárias para a biossíntese de vários osmorreguladores, proteínas com função de proteger macromoléculas e membranas, enzimas de desintoxicação, que auxiliam na manutenção do metabolismo bioquímico e fisiológico, e proteínas de transporte. O segundo grupo é formado por fatores de transcrição, proteína-quinases e proteinases (EL-BASHIT, 2003). A ferramenta molecular tem sido utilizada para elucidar os mecanismos de resposta pela expressão de genes que regulam a osmoproteção e a função de proteínas induzidas por esse estresse (BALBUENA et al., 2011). É possível que alguns desses genes possam ser ativos também em outros genomas, aumentando a tolerância à condição de estresse pela modificação da composição genética em termos de biossínteses e rotas metabólicas, embora essa resposta envolva um complexo de mecanismos que trabalham em conjunto ou isoladamente (BARTOLI et al., 2005).

O amplo conhecimento de genes, proteínas e moléculas sinalizadoras produzidas nas plantas que sofrem estresses requerem a identificação e a caracterização da mudança da expressão gênica, transcriptoma, como também da expressão protéica, proteoma. As proteínas produzidas por diferentes tipos celulares é o resultado final da expressão gênica. Com o desenvolvimento de novas tecnologias, a análise de proteomas têm contribuído significativamente para o estudo da fisiologia de vários organismos. O conhecimento específico sobre a constituição genética dessa planta, certamente, ampliará as possibilidades, mediante a manipulação de seus genes, de inserção de novas características a variedades convencionais, como resistência às doenças, pragas e intempéries

climáticas. Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de comparar o perfil protéico de variedades brasileiras de cana-de-açúcar em resposta ao déficit hídrico, bem como identificar proteínas envolvidas no mecanismo de tolerância à seca.

2. OBJETIVOS

- Analisar o perfil protéico de variedades brasileiras de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico;
- Comparar o perfil protéico de duas variedades comerciais e uma variedade não comercial de cana-de-açúcar;
- Investigar alterações no perfil transcricional de cana-de-açúcar após aplicação foliar de ácido salicílico por meio da técnica de hibridização subtrativa supressiva;
- Confirmar o padrão de expressão diferencial dos genes selecionados por PCR em tempo real.
- Identificar proteínas envolvidas no mecanismo de tolerância à seca em três variedades de cana-de-açúcar utilizando uma abordagem proteômica baseada em 2-DE e MALDI-TOF-MS/MS.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Cana-de-açúcar - Aspectos gerais

A cana-de-açúcar é uma Poaceae, perene na sua forma natural, mas semiperene no cultivo extensivo, com metabolismo fotossintético C₄, teve sua origem na Nova Guiné, onde sua existência era tida como em estado de planta silvestre e ornamental que era usada principalmente no preparo de xarope. Da Nova Guiné, disseminou-se em varias linhas do sul do Oceano Pacifico, na Indochina, no Arquipélago da Malásia e em Bengala, sendo certo o seu aparecimento como planta produtora de açúcar na Índia. A primeira evidência do açúcar em sua forma sólida data do ano 500, na Pérsia (MOZAMBANI et al., 2006). A cana-de-açúcar é cultivada em uma ampla faixa de habitats e altitudes e se estende ao Norte e Sul do Equador ao longo da zona tropical (Figura 1). O ciclo produtivo da cultura pode ser de 12 (cana de ano) e 18 meses (cana de ano e meio) em cana-planta. Após o primeiro corte o ciclo passa a ser de 12 meses, e a partir do primeiro corte passa a ser denominada de cana-soca. A cana-de-açúcar é uma espécie botânica com crescimento do caule em colmos onde se podem observar os nós e entrenós. Ela possui comportamento alógamo, ou seja, tem fecundação cruzada, entretanto, pode ser propagada vegetativamente por meio dos colmos (RODRIGUES, 1995). As folhas são numeradas de acordo com o sistema de Kuijper. A primeira folha de cima para baixo com a bainha vista claramente é designada +1, sendo fotossinteticamente mais ativa. Para baixo elas recebem, sucessivamente, as numerações +2, +3 até terminarem as folhas da planta, conforme ilustrado na Figura 2.

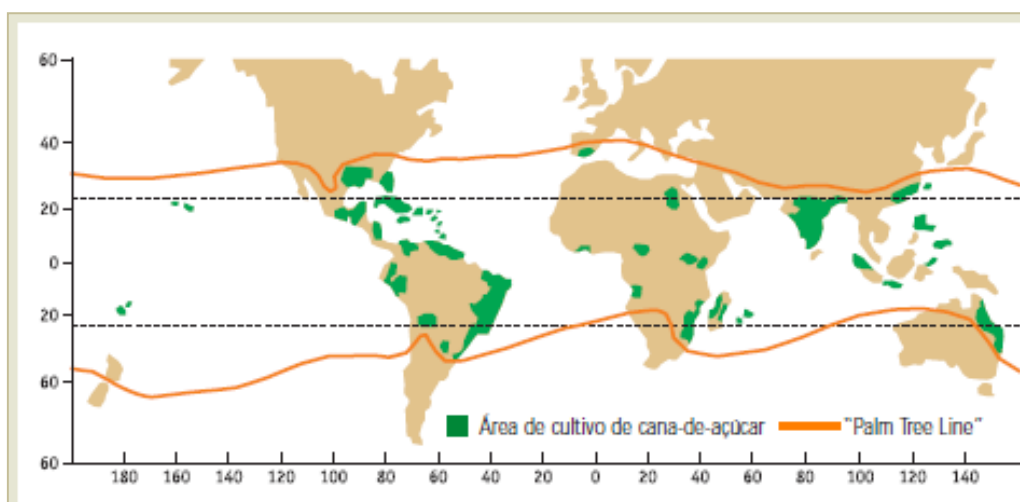


Figura 1. Distribuição geográfica da cana-de-açúcar. O cultivo da cana-de-açúcar existe em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo e se estende ao Norte e ao Sul do Equador, seguindo a distribuição das linhas que delimitam a zona de crescimento das palmeiras e que caracterizam a zona tropical. Fonte: CIB, 2009.

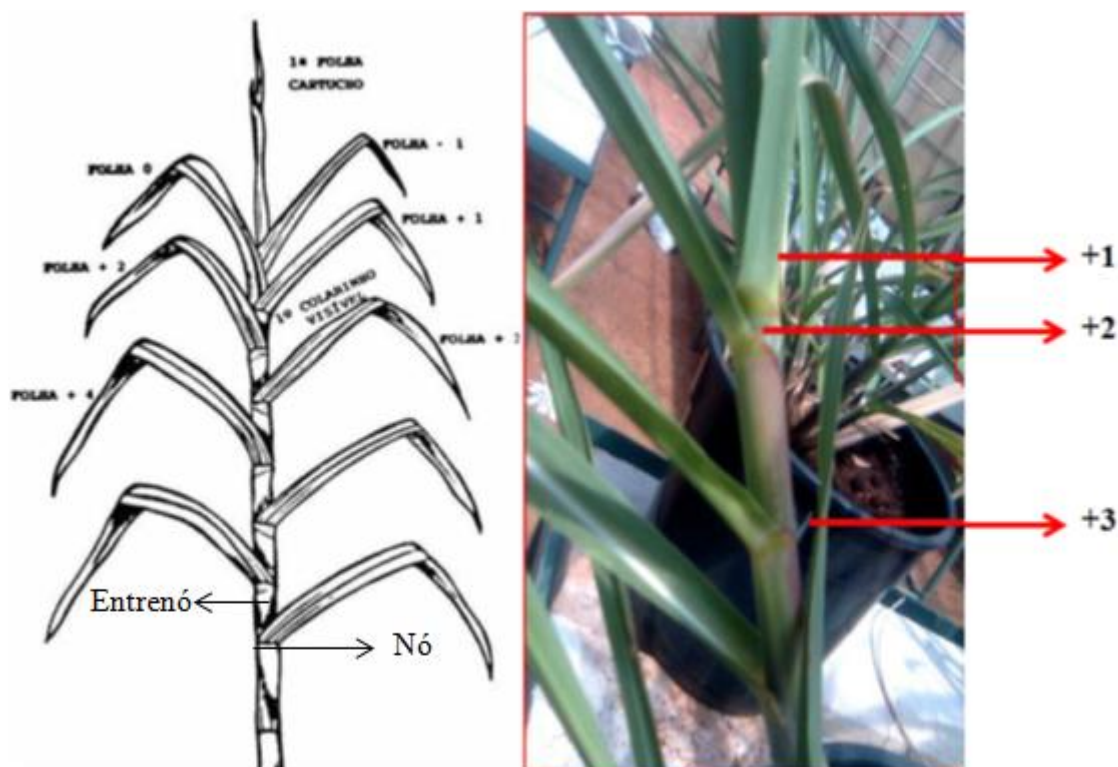


Figura 2. Sistema de numeração de folhas estabelecido por Kuijper. Folhas +1 +2 e +3 são folhas totalmente expandidas e fotossinteticamente ativas. Adaptado de Aline Melro Murad (2010).

As variedades comerciais de cana-de-açúcar cultivadas atualmente se originam de cruzamentos realizados no início do século XX, na Ilha de Java. Algumas variedades da espécie *Saccharum officinarum* – rica em açúcar, mas muito suscetível a doenças – foram cruzadas com outra espécie, a *Saccharum spontaneum*, que é pobre em açúcar e muito rústica, ou seja, mais resistente aos problemas do campo. Os híbridos obtidos tinham maior capacidade de armazenamento de sacarose, resistência a doenças, vigor, rusticidade e tolerância a fatores climáticos. Apesar de *S. officinarum* e *S. spontaneum* terem sido as espécies que mais contribuíram para a obtenção das atuais variedades comerciais de cana-de-açúcar, outras espécies, a exemplo de *S. sinense*, *S. barberi* e *S. robustum*, ainda que em menor proporção, também foram importantes para a composição genética das variedades modernas de cana (CIB, 2009). As características inerentes a cada genótipo definem o número de colmos por planta, assim como a altura e o diâmetro do colmo, o comprimento e a largura das folhas e a arquitetura da parte aérea, sendo a expressão destes caracteres muito influenciada pelo clima, pelo manejo e pelas práticas culturais utilizadas. As características das variedades

influenciam a eficiência fotossintética da cana-de-açúcar, além das variações climáticas que prevalecem durante todo o desenvolvimento (RODRIGUES, 1995).

Em cana-de-açúcar, quatro estádios distintos de crescimento têm sido caracterizados, nomeados: germinação, perfilhamento, grande crescimento e maturação. As fases de perfilhamento juntamente com a de grande crescimento, também conhecidas como fase de formação (2-3 meses após a germinação), têm sido identificadas como um período crítico por demanda de água (RAMESH, 2000). Desta forma, a cana-de-açúcar necessita de 250 partes de água para formar uma parte de matéria seca durante todo o período de crescimento (LARCHER, 2004). Portanto, é neste período onde os danos causados pela deficiência hídrica são mais prejudiciais à produção, e em que experimentos de avaliação de genótipos nos programas de melhoramento, sob essas condições, deveriam ser conduzidos, utilizando mecanismos apropriados, rápidos e eficientes.

3.2. Variedades RB 72910, RB 867515, RB 931011 e RB 943365

As variedades de cana-de-açúcar são consideradas uma das colunas mestres da produção de matéria-prima e do crescimento sustentável do setor sucroenergético. Assim sendo, o melhoramento é, significativamente, a área que contribuiu para este avanço. Nestas últimas três décadas foi marcante a contribuição desta tecnologia, pois permitiu, pelo emprego de variedades geneticamente melhoradas, obter acréscimos de mais de 30% em produtividade agrícola e marcante evolução da qualidade da matéria prima (ALONSO, 2009). Atualmente o Brasil conta com quatro programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar, disponibilizando as atuais e futuras variedades para cultivo e possibilitando os melhores manejos varietais aos produtores, sendo as seguintes: Canavialis (variedades CV); Centro de Tecnologia Canavieira (variedades CTC, sucessor da Copersucar - variedades SP); Instituto Agrônomo de Campinas (variedades IAC); e Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA (variedades RB).

A variedade de cana-de-açúcar RB 72910, é classificada pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar/RIDESA como tolerante ao déficit hídrico, baseado em dados fisiológicos e de produtividade em campo experimental. Esta variedade não apresenta características agrônômicas desejáveis e, portanto

não é comercializada. No entanto pode servir como fonte de genes de resistência / tolerância a estresses abióticos. A variedade RB867515 foi gerada a partir da variedade RB72-454 com genitor desconhecido. Possui boa resistência às doenças fúngicas, como a ferrugem e o carvão e ao vírus do mosaico da cana-de-açúcar. Os melhores destaques desta variedade são boa brotação de soqueira, alto teor de sacarose e de produtividade e a tolerância à seca (HOFFMANN et al., 2008). É a variedade mais cultivada no Brasil. A RB 931011 faz parte do grupo das cinco RBs desenvolvidas pela UFAL, através do Programa de Melhoramento Genético (PMGCA), e lançadas pela RIDESA em 2010. Especifica para solos arenosos e com boa irrigação, é ideal plantar no verão e colher na mesma estação. Esta variedade tem se mostrado bastante tolerante à seca. Já a variedade RB 943365, cultivada comercialmente, apresenta suscetibilidade à deficiência hídrica.

3.3. Estresses abióticos

O estresse é um fator externo que exerce uma influência desvantajosa para a planta (TAIZ; ZEIGER, 2009) que induz mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes. Mesmo se uma condição de estresse é somente temporária, a vitalidade da planta torna-se cada vez menor conforme a duração do mesmo (LARCHER, 2004).

As plantas estão expostas a vários tipos de estresses ambientais que afetam de maneira negativa seu crescimento, metabolismo e produtividade. A seca, salinidade, baixas e altas temperaturas, inundação, poluentes e radiação são os fatores de estresse mais importantes que limitam a produtividade das culturas (LAWLOR, 2002). O estresse hídrico é um fator dos mais importantes quando se pensa em aumentar a produtividade da cultura da cana-de-açúcar. As plantas podem ser afetadas se o ambiente contiver excesso ou se a quantidade ou qualidade de água disponível é insuficiente para suprir as necessidades básicas da planta (TAIZ; ZEIGER, 2009).

No Brasil, dentre os estresses ambientais, o déficit hídrico é o que mais influencia de forma negativa a produtividade da cana-de-açúcar no Centro-Sul e Nordeste - principais regiões produtoras. Assim, seus efeitos nas plantas incluem tamanho das células foliares, potencial de água na planta e redução nas taxas de

assimilação de CO₂, crescimento, transpiração e abertura estomática (TAIZ; ZEIGER, 2009). Desta maneira, o déficit hídrico influencia de maneira direta o crescimento dos perfilhos e a altura final dos colmos e, conseqüentemente, a produção de açúcar (SUGIHARTO, 2004).

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

Quando não é possível evitar a seca, as plantas devem se adaptar à reduzida disponibilidade de água dentro do ambiente. Isto é feito de várias maneiras tais como ajuste osmótico, regulação estomatal e acumulação de osmólitos. A específica resposta à seca é dependente do genótipo da planta e das condições presentes no ambiente.

A tolerância à seca é, conseqüentemente, uma complexa via que ainda precisa ser elucidada completamente, uma vez que as expressões de diversos genes dependem da ação e da interação de caracteres diferentes, tais como: morfológicos (área reduzida da folha, murcha da folha, sistema radicular eficiente), fisiológicos (transpiração reduzida, elevado e eficiente uso de água, o fechamento estomático e ajuste osmótico) e bioquímicos (acúmulo de solutos como prolina e trealose). Sob a seca, as plantas tentam manter o seu índice de água, acumulando vários solutos compatíveis não tóxicos e que não interferem com os processos da planta e que são chamados conseqüentemente solutos compatíveis (VIANA et al., 2005). Alguns deles são prolina, trealose, poliois, glicina betaína e poliaminas. Os diferentes genes responsáveis pela expressão das diferentes enzimas envolvidas na biossíntese dos diferentes osmossolutos foram identificados e clonados de diferentes organismos, tais como: bactérias (SRIVIDYA et al. 2010), leveduras (MIROLIAEI; NEMAT-GORGANI, 2001), mamíferos (CHEN et al. 2004) e plantas (GRENNAN, 2007).

3.3.1. Déficit hídrico em cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar possui variabilidade genética em relação à suscetibilidade ao déficit hídrico, sendo alguns genótipos capazes de tolerar estresses severos e mesmo assim, completar o seu ciclo, enquanto outros não sobrevivem ou sofrem danos severos na sua produção. Esta variabilidade é uma ferramenta muito importante para o desenvolvimento de genótipos tolerantes. Sob condição de estresse, o desempenho de genótipos-elite em relação aos genótipos tradicionais é melhor, e esta diferença é devida principalmente a uma maior tolerância aos estresses e não, por si só, ao aumento da produtividade (DUVICK et al., 2004). A literatura evidencia expressiva variação genotípica na resposta da cultura ao déficit hídrico (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005). Fechamento estomático, abscisão foliar e ajuste osmótico precoce são possíveis mecanismos de tolerância à seca. Esta informação é inexistente para a maioria das variedades, e existe a necessidade de se obter uma melhor compreensão da resposta da cultura à escassez hídrica (SMIT; SINGELS, 2006).

3.4. Avaliações fisiológicas

3.4.1. Teor relativo de água (TRA) e Potencial hídrico foliar (Ψ_w)

O teor relativo de água (TRA) na folha é definido como sendo a quantidade de água de um tecido comparada com a máxima quantidade de água que ele poderá reter em um dado momento (CAIRO, 1995). O controle das funções fisiológicas está diretamente relacionado com o conteúdo hídrico da planta e alterações no TRA afetam diretamente todo o aparato fotossintético. A diminuição do TRA, entre 10% a 20%, foi verificada após 15 dias sob deficiência hídrica diminuindo consideravelmente a taxa de assimilação de CO₂ e a condutância estomática em plantas de *Phaesus vulgaris* (BRESTIC et al. 1995). A resposta fotossintética frente à deficiência hídrica pode apresentar variação de acordo com a cultivar, como observado por Colom e Vazzana (2003) quando estudaram o TRA e a taxa fotossintética de cultivares da gramínea *Eragrostis curvula*, em que constataram que a cultivar tolerante exibiu maior atividade fotossintética associada à maior TRA em comparação a cultivar sensível submetidas à deficiência hídrica. São várias as alterações ocorridas nas plantas devido a escassez de água, porém, é comum

observar que redução de 25% no TRA é responsável por ocasionar uma repressão em todo o aparato fotossintético (SMIT; SINGELS, 2006).

O potencial de água na folha (Ψ_w) diminui com o declínio da disponibilidade de água no solo, levando à perda da turgescência e induzindo também ao fechamento estomático, e tais respostas diferenciam-se de espécie para espécie (MANSUR; BARBOSA, 2000; TAVARES, 2009). O Ψ_w descreve o estado energético foliar, cujos gradientes explicam os fluxos da água no sistema solo-planta-atmosfera. Embora haja variação ao longo do dia, mesmo em plantas irrigadas, essa variável descreve o estado hídrico da planta, e tem sido muito utilizado em estudos das relações hídricas dos vegetais. O valor do Ψ_w indica a diferença entre o estado energético da planta no sistema considerado e num estado de referência. No estado de referência, o potencial da água é considerado zero (BERGONCI et al., 2000).

3.5. Técnicas moleculares para análise de identificação e expressão gênica

A identificação de genes responsáveis por qualidades agronomicamente desejáveis, por meio de técnicas de biologia molecular, podem acelerar o ritmo do melhoramento, identificando uma grande quantidade de genes que podem ser utilizados de forma dirigida para a obtenção de variedades mais produtivas e mais adaptadas a diferentes condições ambientais e mais resistentes a pragas e doenças (NÓBREGA; DORNELAS, 2006).

A tolerância à desidratação em plantas transgênicas tem sido conseguida por meio da transferência de genes induzidos por estresses abióticos. São genes que codificam enzimas reguladoras da biossíntese de aminoácidos como a prolina, citada acima, aminas quaternárias (ex.: poliaminas e glicinobetaína), açúcares (ex.: manitol, trealose, galactinol e rafinose) e proteínas específicas como HSP e LEA, sendo que estas últimas estão intimamente ligadas à desintoxicação celular durante o processo de desidratação. Analisar as funções dos diversos genes expressos sob condições adversas às plantas é essencial para que os estudiosos da área de manipulação genética entendam os mecanismos moleculares que governam as respostas vegetais aos diversos tipos de estresses (SHINOZAKI et al., 2005).

A aplicação de ferramentas de pós-genômica já forneceu pistas significativas para melhorar a nossa compreensão das respostas das plantas a estresses abióticos, ataque de patógenos ou interações simbióticas. A expressão de alterações

genéticas estão sendo monitoradas em vários sistemas, quer por macroarranjos, microarranjos ou hibridização subtrativa por supressão ((FELIX et al., 2002; WANG et al., 2008). Os arranjos de DNA são suportes sólidos, comumente vidro (microarranjos) ou náilon (macroarranjos), aos quais estão fixadas, de forma ordenada, seqüências completas ou parciais de genes. O DNA dos genes é depositado em membranas réplicas, contendo os mesmos genes nas mesmas posições, em densidades que variam de 10 a 1000 genes/cm². A partir do RNA das células em estudo são produzidas sondas de cDNA via transcrição reversa na presença de um nucleotídeo radioativo, que permite sua detecção posterior. Quanto maior a expressão de um gene, maior a quantidade de alvo marcado e, por consequência, maior o sinal de hibridização da sonda (FELIX et al., 2002). As limitações da técnica referem-se principalmente à disponibilidade e identidade das seqüências para a construção dos arranjos e à análise estatística que é complexa, com a ocorrência de falsos positivos, exigindo, portanto, o uso de outras técnicas de quantificação de transcritos, como PCR quantitativo, por exemplo.

3.5.1. Hibridização subtrativa por supressão (HSS)

Existem diversas estratégias para identificação de transcritos preferencialmente expressos, uma das mais promissoras é técnica de hibridização subtrativa supressiva (HSS). Essa metodologia para o isolamento de genes diferencialmente expressos foi desenvolvida por Diatchenko et al. (1996), e permite comparar duas populações de mRNA e obter clones de transcritos que estão sendo expressos diferencialmente em um determinado tecido ou órgão, sob influência de uma determinada condição do ambiente, num determinado momento, resultando em uma mini-biblioteca enriquecida de genes, fornecendo amplo material para a comparação de populações de mRNAs (Figura 3). A técnica HSS baseia-se em converter as populações de mRNA em cDNA, onde uma população de cDNA que contém os genes de interesse (normalmente obtido de tecido que sofreram o estresse) é chamado de "tester" e o cDNA da outra população (normalmente obtido de tecido que não sofre estresse) é chamado de "driver". As duas populações de cDNA "tester" e "driver" passam por um processo de hibridização subtrativa, ou seja, eliminação dos cDNA comuns as duas populações e, posteriormente são amplificados por PCR, apenas os cDNA que são expressos na população de

interesse. Sua principal vantagem é a ausência de introns nas seqüências clonadas, o que facilita a identificação de seqüências expressas, pois somente a seqüência codificante (éxons) é clonada (MALONE et al., 2006). Diversos estudos tem sido realizados com sucesso na identificação de genes diferencialmente expressos em resposta a fatores bióticos e abióticos em plantas (AMARAL et al., 2008; XIONG et al., 2001; SHI et al., 2005)

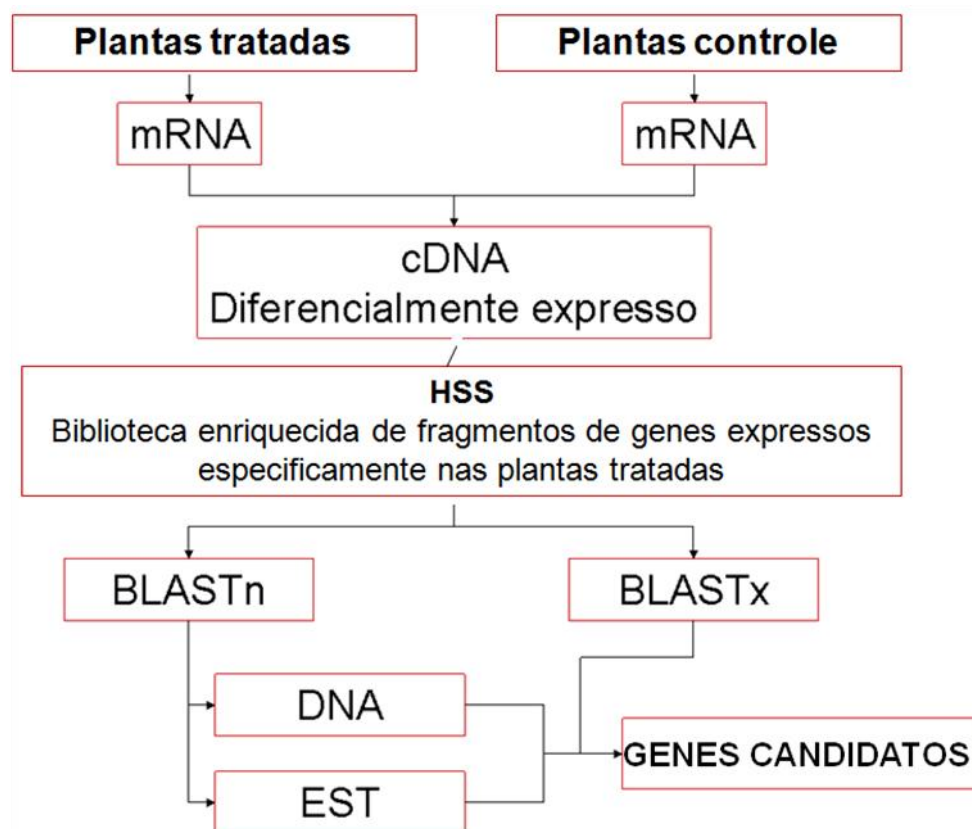


Figura 3. Fluxograma esquemático do desenvolvimento e análise da hibridização subtrativa supressiva (HSS).

3.5.2. PCR em tempo real (qRT-PCR)

A tecnologia conhecida como *Polimerase Chain Reaction* – PCR – é utilizada para copiar e amplificar a quantidade de DNA em uma amostra. PCR em tempo real ou quantitativo (qRT-PCR) é uma ferramenta altamente sensível capaz de detectar e quantificar os produtos de amplificação de uma reação de PCR em relação a um gene constitutivo. A detecção para quantificar os produtos da amplificação é realizada por meio de marcadores fluorescentes. O marcador mais comumente utilizado é o corante SYBR Green I, o qual possui a capacidade de se intercalar à dupla fita de DNA e emitir sinal fluorescente, quando excitado, no comprimento de onda de 494 a 521 nm. O sinal emitido é utilizado para determinar a quantidade de produtos amplificados presente em cada ciclo da reação. Quando a reação atinge o início da fase exponencial, ou seja, quando há aumento de sinal associado à formação exponencial do produto de PCR, ocorre a quantificação propriamente dita e é alcançado o valor de *Ct* (limiar do ciclo de detecção – “cycle threshold”). A fluorescência emitida abaixo desse valor é considerada ruído de fundo (“background”) (WONG; MEDRANO, 2005). Esta técnica pode ser utilizada com duas abordagens distintas: quantificação relativa ou absoluta. A quantificação relativa indica variações quantitativas em uma sequência alvo comparado a um gene de referência, estimando alterações em nível de expressão do RNAm. Já a absoluta expressa a quantidade exata de ácidos nucleicos em relação a uma unidade específica (ng/reação, células/mL).

Atualmente a técnica de PCR quantitativo é uma potente e rotineira ferramenta de análise de expressão gênica e quantificação e também apresenta muitas vantagens quando comparada com outras técnicas. A sensibilidade da técnica é uma dessas vantagens; estima-se que a análise por PCR em tempo real é 10.000 a 100.000 vezes mais sensível que métodos por ensaios de proteção com RNase e 1.000 vezes mais sensível que a hibridização *dot blot*. A pequena quantidade de amostra necessária para a reação também é um fator positivo na escolha dessa técnica quantitativa. Por outro lado, a maior desvantagem dessa tecnologia é o alto preço de seus reagentes e equipamentos (WONG; MEDRANO, 2005).

3.5.3. Proteômica

Proteômica estuda o conjunto de proteínas sintetizadas por uma célula ou conjunto de células em um determinado estágio de desenvolvimento ou sob condições ambientais específicas. A caracterização geral do proteoma com identificação do maior número possível de proteínas ou das proteínas diferencialmente expressas entre duas amostras com características fenotípicas contrastantes é um dos procedimentos comumente adotados na proteômica. O fluxo experimental normalmente utilizado na proteômica consiste na extração de proteínas, separação, quantificação e, por último, na sua identificação (Figura 4).

Com o objetivo de obter perfis de proteínas em amostras biológicas, a proteômica tem sido associado com as técnicas de eletroforese bidimensional em gel (2-DE) e espectrometria de massa (MS). Na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico pela focalização isolétrica, na primeira dimensão. Na segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com suas massas moleculares. Centenas de proteínas podem ser resolvidas em matriz de poliacrilamida, permitindo obter um mapa proteico global para um determinado tipo celular. A análise comparativa dos mapas gerados permite a identificação de proteínas com acúmulo diferencial, induzidas ou suprimidas sob diferentes condições (GUERREIRO et al., 1997). Posteriormente, os géis são corados, digitalizados, e as imagens produzidas analisadas através de programas de análise de imagens. Além da 2-DE, outras técnicas de fracionamento protéico também têm sido utilizadas com sucesso, como a MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*) em que os peptídeos, previamente digeridos em uma solução protéica, são fracionados em uma coluna de troca catiônica e, posteriormente, em uma fase reversa (AGRAWAL et al., 2008). A eletroforese unidimensional também pode ser utilizada para fracionamento de misturas protéicas complexas, permitindo análises globais do proteoma em estudo, já que permite a melhor detecção de proteínas pouco abundantes (GAO et al., 2008).

A espectrometria de massas (MS) é utilizada para identificação das proteínas através da comparação das massas e sequências dos peptídeos gerados após digestão enzimática com sequências de proteínas depositadas em bancos de dados públicos. A espectrometria de massas mede rapidamente, com grande precisão e sensibilidade, a massa molecular de átomos ou moléculas em Dalton (Da), a partir

da razão entre a massa e a carga de moléculas ionizadas (m/z) (DASS, 2007). Para a identificação das proteínas, os programas basicamente interpretam os espectros de fragmentação das proteínas e convertem essas informações em massas de peptídeos ou sequências de aminoácidos dependendo dos recursos dos equipamentos utilizados (SHEVCHENKO et al., 2001). Os programas realizam digestões teóricas em proteínas depositadas em bancos de dados e comparam esses valores com os dados experimentais. As comparações entre informações teóricas e experimentais geram listas de proteínas com diferentes graus de homologia e são ordenadas de acordo com uma probabilidade estatística, determinada pelo método de cálculo do algoritmo e pelos parâmetros de tolerância definidos pelo pesquisador (CHAMRAD et al., 2003).

A análise diferencial de proteomas tem sido utilizada em diversos estudos. Mudanças na expressão gênica a níveis transcricionais e pós-transcricionais foram demonstrados inicialmente pela análise do perfil protéico de plantas de tabaco submetidas ao estresse salino. Ericson e Alfinito, 1984, estudaram culturas de células de tabaco submetidas a estresse salino em meio líquido contendo 10 g.L⁻¹ de NaCl por 12 dias, obtendo um decréscimo do crescimento celular no tratamento salino, em comparação ao controle. Também observaram uma alteração na expressão de proteínas. Certas proteínas, analisadas em géis unidimensionais, de massa molecular de 20 kDa e 32 kDa aumentaram sua concentração e, em géis 2-DE, proteínas de 26 kDa que apareceram no tratamento salino não foram encontradas em géis controles, indicando uma modificação do padrão de expressão protéica sob condições de estresse.

O arroz (*Oryza sativa* L.), espécie aceita como modelo dentre as monocotiledôneas, teve seu proteoma seqüenciado por meio de diversas técnicas, dentre elas 2D e MS (AGRAWAL; RAKWAL, 2006). Outros importantes cereais como o milho e o trigo também já tiveram o proteoma de diversos tecidos extensivamente analisados, inclusive após serem submetidos a estresses bióticos e abióticos (CHANG et al. 2000; MAJOUL et al., 2004). Que et al.(2010) avaliaram a expressão proteômica diferencial em cana-de-açúcar em resposta ao ataque do patógeno *Sporisorium scitamineum*. Das 23 proteínas diferencialmente expressas identificadas por MALDI-TOF-TOF/MS, 20 foram relacionadas à fotossíntese, transdução de sinal e resistência a doenças. Enquanto a função das três proteínas restantes não foi determinada. Jangpromma et al. (2010) utilizaram esta técnica

para analisar a função fisiológica de proteínas da folha de cana envolvidas no déficit hídrico. Eles encontraram uma proteína, p18, como super-expressada na variedade tolerante à seca em relação à variedade sucestível. Indicando ser, esta proteína, um bom candidato para o desenvolvimento como marcador em plantas tolerantes à seca.

Recentes estudos tem sido realizados no intuito de buscar genes expressos diferencialmente em resposta à estresses abióticos em cana-de-açúcar. Prabu et al. (2011) submeteram a cultivar Co740 a vários níveis de deficiência hídrica para isolar transcritos em resposta a esse estresse. Após construção de uma biblioteca subtrativa, os autores identificaram 158 clones que foram seqüenciados e revelaram que a maioria codificava para proteínas envolvidas na organização celular, metabolismo de proteínas, transdução de sinal e transcrição. Adicionalmente, análises de RT-PCR semi-quantitativo realizado para cinco genes revelou a participação destes ESTs na tolerância ao estresse. Zhou et al. (2011), avaliaram a expressão de proteínas em folhas de uma variedade de cana, ROC22, em resposta ao estresse osmótico. Os autores utilizaram 2-DE e MALDI-TOF-MS. Os resultados obtidos sugerem a que a seca induziu proteínas relacionadas a fotossíntese, metabolismo energético e defesa antioxidante.

Na era pós-genômica, a proteômica está posicionada no centro da genômica funcional para estudar a função gênica em larga- escala. Sua principal característica é a viabilidade para analisar as mudanças que ocorrem no nível de proteína que não pode ser previsto a partir de seqüência genômica. A proteômica pode eventualmente revelar todos os proteínas em uma célula ou tecido em um determinado momento, incluindo as com modificações pós-traducionais. Constituindo certamente uma poderosa ferramentas para revelar a função dos genes na biologia vegetal.

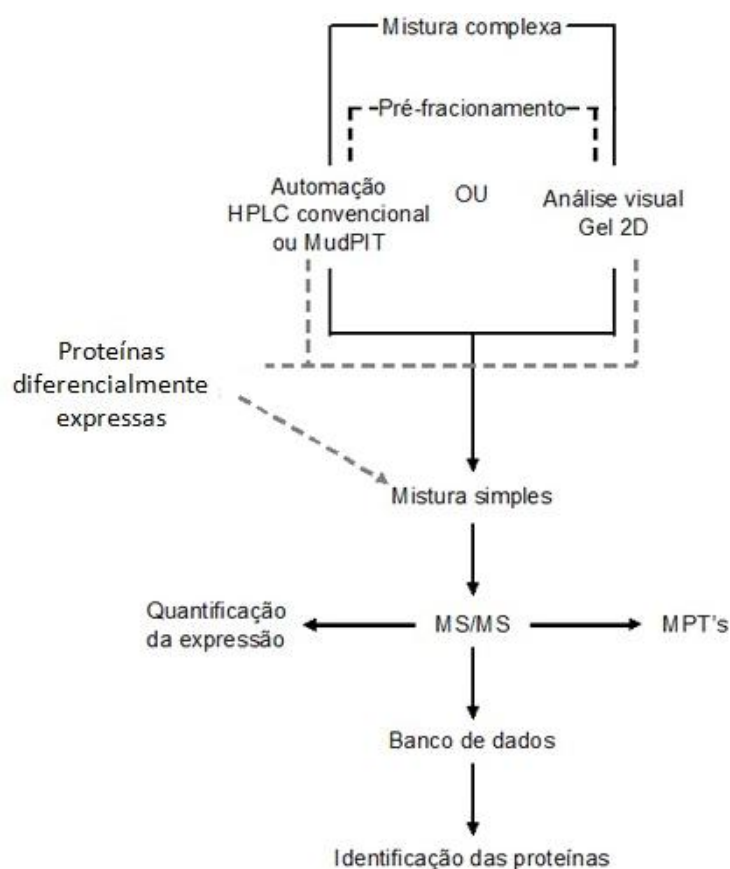


Figura 4 - Fluxo experimental de um estudo proteômico. A mistura complexa de proteínas resultantes da extração de proteínas totais pode ser resolvida por meio de HPLC (*high performace liquid cromatography*) convencional ou do sistema MudPIT (*multidimensional protein identification technology*), e/ou ainda utilizando géis. Uma vez obtida uma mistura simples, esta é submetida ao sequenciamento para identificação das proteínas. Os espectros de massa/carga obtidos podem ainda ser utilizados na quantificação dos níveis de expressão de proteínas de interesse e na identificação de modificações pós-traducionais (MPT's). O sequenciamento MS/MS pode ainda ser destinado à identificação em larga escala de proteínas, previamente isoladas, que apresentam interações moleculares. (adaptado de Salvato; Carvalho, 2010).

4. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL G. K.; R. RAKWAL. Rice proteomics: A cornerstone for cereal food crop proteomes. **Mass Spectrometry Reviews**, v.25: 1-53, 2006.
- AGRAWAL, G. K. et al. Thelen. In-depth investigation of the soybean seed-filling proteome and comparison with a parallel study of rapeseed. **Plant Physiology**, v.148, p.504-518, 2008.
- AMARAL, D. O. J. et al. Differential gene expression, induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection, in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol.43, no.8, p.000-000, 2008.
- ALMEIDA, B.S.V. **Análise do proteoma do fluido intercelular de folhas de laranjeiras infectadas com *Xylella fastidiosa***. 2001. 60 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 2001
- ALONSO, O. Raios X dos canaviais: censo revela variedades mais cultivadas. **Revista Canavieiros**, Sertãozinho, Ed.39, ano IV, p.20-21, 2009.
- BALBUENA, T.S. et al. Challenges in proteome analyses of tropical plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 23, n.2, p. 91-104, 2011
- BARTOLI, C. G. et al. Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. **Plant Cell Environment**, 28, p.1073–1081, 2005.
- BERGONCI, J. I.; BERLATO, M. A.; SANTOS, A. O. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35 (8), p. 1531-1540, 2000.
- BRESTIC, M. Does photorespiration protect the photosynthetic apparatus in French bean leaves from photoinhibition during drought stress? **Planta**, Heidelberg, v. 196, n. 3, p.450-457, 1995.
- CAIRO, P. A. R. **Curso básico de relações hídricas de plantas**. Vitória da Conquista: UESB, 1995. 32 p.
- CHAMRAD, D. C. et al. Interpretation of mass spectrometry data for high throughput proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.376, p.1014–1022, 2003.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, p. 1-21, 2011.
- CHEN, Q.; HADDAD, G. G. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammal. **Journal of Experimental Biology**, v.207, n.18, p.3125-3129, 2004.

CIB - Conselho de Informações sobre Biotecnologia. **Guia da Cana de Açúcar**. Setembro, 2009. Disponível em: http://www.cib.org.br/pdf/guia_cana.pdf. Acesso em 03 dez. 2011.

COLOM, M. R.; VAZZANA, C. Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought sensitive weeping lovegrass plants. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v. 49, n. 2, p. 135-144, 2003.

CONAB - **Compahia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da Safra Brasileira Safra 2011/2012. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_08_30_13_41_19_boletim_cana_portugues_-_agosto_2011_2o_lev..pdf. Acesso em 27 set. 2011.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. Hoboken, Wiley-interscience, 577p. 2007.

DIATCHENKO, L. et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.93, p. 6025-6030, 1996.

DUVICK, D. N, SMITH, J. S. C; COOPER, M. Long-term selection in a commercial hybrid maize breeding program. **Plant Breeding Reviews**, v.24, n.2, p. 109-151, 2004.

EL-BASHIT, T. **Trehalose metabolism in wheat and identification of trehalose metabolizing enzymes under abiotic stress conditions**. 2003. 120 f. Tese (Doctor of Philosophy) - The Middle East Technical University, Turkey. 2003.

ERICSON, M. C.; ALFINITO, S. H.. Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture. **Plant Physiology**, v.74, p.506-509, 1984.

ESTEVES, B.S.; SUZUKI, M.S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n.4, p.663-679, 2008.

FELIX, J. M. et al. Genoma funcional. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.24, jan/fev, 2002.

GAO, B. B. L.; STUART, E.; FEENER, P. Label-free quantiative analysis of one-dimensional PAGE LC/MS/MS proteome: application on angiotensin II-stimulated smooth muscle cells secretome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.7, p.2399-2409, 2008.

GUERREIRO, N. et al. New Rhizobium leguminosarum flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. **Molecular Plant Microbe Interations**, v.10, n4, p.506-516, 1997.

IDEA – **IDEA Consultoria**. Irrigação e manejo varietal são as soluções para o Nordeste. Disponível em: <http://www.ideaonline.com.br/artigo/irrigacao-e-manejo-varietal-sao-as-solucoes-para-o-nordeste.html>. Acesso em 01 out. 2011.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v. 92, p. 185-202, 2005.

JANGPROMMA, N. et al. A proteomics analysis of drought stress responsive proteins as biomarker for drought-tolerant sugarcane cultivars. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.6, p. 89–102, 2010.

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

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

MAJOUL, T. et al. Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, p.505-513, 2004

MANSUR, R. J. C. N.; BARBOSA, D. C. A. Comportamento fisiológico em plantas jovens de quatro espécies lenhosas da caatinga submetidas a dois ciclos de estresse hídrico. **Phyton**, Buenos Aires, n. 68, p. 97-106, 2000.

MOLINARI, H. B. C. et al. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Obs.X *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v.167, p.1375-1381, 2004.

MOZAMBANI, A. E. et al. História e Morfologia da Cana-de-Açúcar. In: SEGATO, S.V. (Org). **Atualização em Produção de Cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livro Ceres, 2006, p.11-17.

NÓBREGAS, J. C. M.; DORNELAS, M. C. Biotecnologia e melhoramento da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V. (Org). **Atualização em produção em cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livros Ceres, 2006. P.39-56.

PIMENTEL, C. **A Relação da Planta com a Água**. EDUR, Seropédica, Rio de Janeiro, 191p. 2004.

PRABU, G. R. et al. Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane; **Plant Molecular Biology Reporter**, v.29, p. 291–304, 2011.

QUE, Y. et al. Differential Protein Expression in Sugarcane during Sugarcane-Sporisorium scitamineum Interaction Revealed by 2-DE and MALDI-TOF-TOF/MS. **Comparative and Functional Genomics**, p.2-10, 2011.

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

RODRIGUES, J. D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: UNESP, 1995. 100 p.

SALVATO F.; CARVALHO, M. C. C. G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.3, p. 727-734, mar, 2010.

SHI, Y.J, et al. Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. **Molecular Cell**, v.19, p.857-864, 2005.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.410–417, 2005.

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

SUGIHARTO, B. Biochemical and molecular studies on sucrose-phosphate synthase and drought Inducible-protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Journal ILMU DASAR**, v. 5, n. 1, p. 62-67, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4a ed., Porto Alegre: ARTMED Editora S.A.,2009.

TAVARES, A. C. S. **Sensibilidade da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) ao excesso de água no solo**. 2009, 220 f. Tese (Doutorado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2009.

VIANA, Y. A.; GARROTE FILHO, M. S.; PENHA-SILVA, N. Protein Stabilization by Osmolytes. **Bioscience Journal**, v.21, n.2, p.83-88, 2005.

WANG, W. X. et al. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. **Acta Horticulturae**, v.560, p.285–292, 2001.

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

WANG, H.Y et al. Suppression subtractive hybridization identifies differentially expressed genes in *Brassica napus* chlorophyll-reduced mutant. **Transformation**, v. 52, Issue: 3, p. 486-492, 2008.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, vol.39, no.1, p.1-11, 2005.

XIONG, L.; LEE, M. W.; QI, M.; YANG, Y. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, n.5, p.685-692, 2001.

ZHOU, G. et al. Proteomic Analysis of Osmotic Stress-Responsive Proteins in Sugarcane Leaves, **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 27, p.185–188, 2011.

CAPÍTULO I

DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN SUGARCANE UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS

Differential gene expression in sugarcane under abiotic stress conditions

Clebia M A Almeida,^{1,*} Virginia M T S Donato,² Daniel O J Amaral,¹ Gaus S A Lima,³ Giovani G Brito,⁴ Marleide M A Lima,⁵ Maria Tereza S Correia⁶ and Márcia V Silva⁶

¹Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. CEP: 50670-420, Brasil. Phone/Fax +55(81)2126-8354; Email: clebia.almeida@gmail.com; danieljornal@yahoo.com.br;

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP: 52171-900 – Recife - PE., Brasil. Phone +55 81 3320 6350; Email: ymtsdonato@uol.com.br

³Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal de Alagoas, CEP: 57072-970, Maceió – AL, Brasil. Phone +55 82 3261-135; Email: gausandrade@yahoo.com.br

⁴EMBRAPA Algodão, Caixa Postal 174, CEP: 58107-720, Campina Grande – PB, Brasil. Phone: 55 83 3182-4300/Fax 55 83 3182-4367; marleide@cnpa.embrapa.br

⁵EMBRAPA Algodão – Núcleo Cerrado, Caixa Postal 179, CEP: 58107-720, Santo Antônio de Goiás - GO, Brasil. giovani@cnpa.embrapa.br

⁶Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. CEP: 50670-420, Brasil. Phone/Fax +55(81)2126-8354; mtscorreia@gmail.com; marcia.vanusa@ufpe.br

* Corresponding author. Email: clebia.almeida@gmail.com
Phone/Fax +55(81)2126-8354

Abstract

The objective of this work was to determine the transcript profile of sugarcane plants after foliar application of salicylic acid (SA) as well as to analyse gene expression of a gene involved in the response to drought. The SA plays an important regulatory role in multiple physiological processes including plant immune response. The suppression subtractive hybridization (SSH) technique was used to generate a cDNA library enriched for transcripts differentially expressed. RT-PCR and quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was used to analyse gene expression of trehalose-6-phosphate in a tolerant genotype under water deficit conditions. A total of 122 clones were identified in the SA library which allowed the identification of four gene groups that play different roles. One such group of genes identified is responsible for the synthesis of sucrose-phosphate, which is involved in response to drought. The SSH technique is effective for identification of tolerant genes activated by salicylic acid. qRT-PCR analysis, showed increased expression of trehalose in plants subjected to 10% soil moisture, confirming that the gene is differentially expressed in water deficit conditions. These results reveal the potential of the identified gene for future studies aiming at more water deficit-tolerant varieties based on genetic transformation.

Keywords: Real-time PCR; suppression subtractive hybridization; Salicylic acids, water deficit

Introduction

Expression profiling has become an important tool to investigate how an organism responds to environmental changes. Plants have the ability to alter their gene expression patterns in response to environmental changes such as temperature, water availability or the presence of deleterious levels of ions (Rodriguez et al. 2005). In plants, exogenous application of salicylic acid (SA) or its derivatives affects diverse processes which trigger defense response to abiotic stress tolerance. Among abiotic stresses, SA has been reported to counter water stress (Shamsul Hayat et al. 2009; An and Mou 2011).

The production of sugarcane is negatively influenced by a vast number of environmental factors that affect growth, metabolism and yield. Of these, the strongest and most frequent negative influence on sugarcane yield in Brazil is drought. Plants commonly respond to water deficit by accumulating sugars and other compatible osmoprotecting solutes. One of these components is the non-reducing sugar trehalose, a glucose disaccharide that works as a compatible solute in the cell (Mahajan and Tuteja 2005).

Considering the importance of the sugarcane crop and water deficit as an environmental factor limiting its production, it is necessary to identify and characterize candidate genes involved in the response to water deficit to obtain more tolerant varieties. To understand the molecular regulation of the stress response, the relevant subsets of differentially expressed genes of interest must be identified, cloned, and studied in detail. High throughput detection of differential expression of genes is an efficient means of identifying genes and pathways that may play a role in biological systems under certain experimental conditions. There exist a variety of approaches that could be used to identify groups of genes that change in expression in response to a particular stimulus or environment. Suppression subtractive hybridization (SSH) has been a powerful approach to identify and isolate cDNAs of differentially expressed genes (Rodriguez et al. 2005).

To investigate alterations in the transcriptional profiles of sugarcane after foliar application of salicylic acid, suppression subtractive hybridization (SSH) was employed to identify differentially expressed genes. A second objective was to analyse gene expression of a gene involved in the response to water-deficit.

Together, these results provide important information for developing of future studies aiming at more water-deficit-tolerant varieties based on genetic transformation.

Material and Methods

SSH experiment

Sugarcane plants, variety RB72910 were germinated aseptically on MS culture medium (0.8% w/v agar), with the pH adjusted to 5.8 ± 0.2 , photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of dark, and temperature at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Plants were kept in these conditions for four weeks after germination. Four-week old plants were, then, treated with 5 mM sodium salicylate (Sigma USA) dissolved in autoclaved distilled water. Control plants were sprayed with autoclaved distilled water. Leaves of ten plants were harvested 24 hours after the treatment, mixed and used for total RNA extraction. The leaves of young plants were used to extract the mRNA required for the synthesis of a cDNA library.

For total RNA extraction, the leaves from untreated and SA treated plants were used with Trizol (100 mg mL⁻¹). RNA yield was 50 mg per 100 mg of plant tissue. Complementary DNA was obtained through SMART PCR cDNA Synthesis Kit. Suppression subtractive hybridization was performed with the PCR-select cDNA subtraction kit. Treated and control samples were processed simultaneously to reduce false positives. Complementary DNA, prepared from the treated samples, was used as “tester”, and that from the control sample as “driver”, for the forward subtraction carried out to isolate fragments corresponding to genes whose expression level was increased following the treatments. Cloned PCR products, in the vector T/A PCR2.1 TOPO were, then, transformed with DH5a competent cells to produce all the subtracted libraries (forward SSH), according to manufacturer's instructions. Cell colonies were transferred to LB liquid medium containing 100 µg mL⁻¹ kanamycin, and were cultured for 16 hours. Plasmid DNA was extracted by the alkaline lysis miniprep method (Sambrook & Russell, 2001). Recombinant plasmids were identified, by restriction analysis, and subjected to DNA sequencing. Nucleotide sequences of each insert were determined in an automatic DNA sequencer (ABI PRISM 377), with the Big Dye Terminator kit. Conventional M13-forward and M13-reverse primers were used to determine DNA sequences. Obtained sequences were compared with the ones in the databanks of: the National Center for Biotechnology Information, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), using the

program BlastX (Altschul et al., 1997); the Institute for Genomic Research, TIGR (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgibin/tgi/Blast/index.cgi>); and the DNA Data Bank of Japan, DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast>). Sequences were aligned with the software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk>) (Thompson et al. 1994).

Water-deficit experiment and expression of trehalose gene

After the identifying genes, by SSH, that play a role in stress tolerance such as synthesis of sucrose-phosphate was investigated changes in gene expression during imposition of the water stress. In this study the trehalose gene of *Saccharum officinarum* (SoTPS) was gene expression analysed into a tolerant genotype by the quantitative real-time PCR technique under water deficit conditions.

Plant material and treatment

Sugarcane plants, variety RB 72910, were planted and grown in PVC pots containing 30 kg soil for 60 days with no water restriction. After this period, to induce water deficit, plants were subjected to one of five soil water levels, determined by the oven official method: 100% gravimetric soil moisture was considered the control treatment; 50% was no stress; 40% was moderate stress; and 20% and 10% were severe stress. The experiment was carried out in a greenhouse (29°C and 70% RH).

Amplification of trehalose gene

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from leaves using the reagent Trizol[®] (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. An aliquot of 1 µg total RNA was used as the template in the semi-quantitative RT-PCR analysis using a One-Step RT-PCR kit (Invitrogen). The specific-primers pair (F: 5'GCAGATATCGAATTCGGG3' and R: 5'TTAAGGTGAGGAAGTGGTGTCTAG3') were designed to anneal in a conserved trehalose region of plants. RT-PCR was performed under the following conditions: 50°C for 30 min and 94°C for 3 min, followed by 35 amplification cycles (94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec and 72°C for 1 min) and 7 min at 72°C. The plant-specific primer pair that amplifies the translation elongation factor 1α (EF-1αF:5'GACAATCAAGCACTGGAGCA3' and EF-1αR:

5'GATGCTACCACCCCAAGTA3') was used as the control in the RT-PCR experiments. The final amplification product was separated on a 1.5% agarose gel.

Real-time PCR analysis (qRT-PCR)

Complementary DNAs (cDNA) were synthesized from 5 µg of total RNA using SuperScript III[®] as described by the manufacturer. A region of the trehalose mRNA was amplified using primers F: 5'GGCGCGATGCATGAGAAGTACAAT3' R: 5'TGTCCTCTGGCCACCTCAATTCTT3'. Real-time PCR amplifications were performed in a Mastercycler ep realplex (Eppendorf) using the Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). The reaction conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 2 min followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 20 s, 68°C for 20 s followed by melting curve analysis. The relative quantification followed the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001), normalized to the constitutive gene *14-3-3* using the specific primers *14-3-3F* (5'CAACTTGACCCTGTGGACCT3') and *14-3-3R* (5'ACCCACCTCGTAGCAATGTC3').

Sequence and phylogenetic analysis

The trehalose gene *SoTPS* was sequenced on both strands in an ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) sequencer. Sequences were compared to those in Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequence analyses of amino acids deduced from gene *SoT6P* and TPSs of other organisms were aligned using ClustalW, and a phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method with MEGA 3.1 (Kumar et al. 2004). The reliability of the tree was measured by bootstrap analysis with 1500 simulations and edited with MEGA 3.1.

Results and Discussion

With aim to isolate cDNA clones corresponding defense genes related abiotic stress in sugarcane, cDNA library was constructed through SSH technique, with genes induced by salicylic acid (SA library). One of the main advantages of SSH is that it normalizes the cDNA abundance, so that cDNAs encoded by genes which are expressed infrequently, but nonetheless differentially, can be identified readily

(Kürkcüoğlu, et al. 2006). After SSH, 122 cDNA clones were obtained with Inserted length ranged from 200 to 1.600 bp. Clone similarity was considered at E-values lower than 10^{-5} in the different data banks analyzed, being, thus, significant (Fernández et al, 2003). In the SA library were identified four gene groups presenting different functions (Fig. 1). Of these, 40 clones showed no similarity with data bank sequences, 37 represented genes involved in defense mechanisms, 24 were similar to putative proteins with unknown roles and 21 clones were associated to cell maintenance and plant development. Plant genes with known roles, involved in biotic and abiotic stress response and associated to cell maintenance and plant development, were identified in SA library. Some of these genes (Table 1) as those encoding sucrose-phosphate synthase are related to cell metabolism. Sucrose occupies a central position in the metabolism of all plants and has many roles: transport sugar, storage reserve, compatible solute, and signal compound. (Castleden et al. 2004).

A better understanding of the genes that are expressed in response to abiotic stress, such as water deficit are needed to characterize fully the mechanisms that permit adaptation to limiting water conditions (Bray 2004). Suppression subtractive hybridization combines suppression PCR with subtraction and normalization steps in a single reaction, increasing, therefore, the possibility of identifying low expressed genes (Moody 2001). Genes with unknown roles were identified in SA library which indicates the possibility of identifying new genes which have not yet been reported in previous studies of stress/tolerance response. Similar results were observed in SSH libraries from *Arabidopsis* in abiotic stress conditions (Mahalingam et al. 2003) and Tomato (Amaral et al. 2008).

After the identifying genes, by SSH, we investigated the differential gene expression of a trehalose-6-phosphate in sugarcane plants under water-deficit conditions. One of the best-documented physiological/molecular responses to water deficit in plants is the ability of some species to adjust cell osmosis (Nepomuceno et al. 2002). Nonreducing disaccharides, e.g., trehalose, have been reported as one of the most effective osmoprotectants in terms of minimal required concentration (Avonce et al. 2004; Iordachescu and Imai 2008).

Diverse techniques are used in gene expression analysis, e.g., Northern blotting, RT-PCR and quantitative real-time PCR, of which Northern blotting is most commonly used. However, this technique is slow and requires a relatively large

quantity of mRNA. RT-PCR, on the other hand, is quicker, more sensitive and can be more specific than Northern blotting (Dean et al. 2002). Additionally, qPCR provides higher sensitivity for the detection of DNA or RNA due to the combination of amplification performed by PCR and the detection system (Bustin 2000).

In this study, the *SoTPS* gene trehalose biosynthesis was expressed differentially in variety RB 72910 in the different leaf tissues and treatments. Plant leaves and roots subjected to diverse stress levels were collected, and total RNA was extracted efficiently. Reverse transcription reactions followed by PCR (RT-PCR) and quantitative PCR (qPCR) were performed to study trehalose expression. For the analysis of quantitative real-time PCR, we designed a new pair of primers. These primers amplify smaller fragments that are only 200 base pairs (bp), which provides more consistent results due to greater efficiency and tolerance of PCR reaction conditions (Wong and Medrano 2005). The constitutive *14-3-3* gene was chosen as a known suitable reference gene for expression normalization in a wide range of sugarcane tissue samples (Papini-Terzi et al. 2005). During the experiments, no expression of the trehalose gene was observed in the root tissue. In the leaves, expression of the trehalose gene was demonstrated in plants subjected to severe stress (Treatment 4: 18 days without watering and 10% soil moisture) (Fig. 2A). Plants grown under this treatment were also analyzed by real time PCR, which revealed an expression of the gene for trehalose of approximately two times that of the control treatment. Detection of the trehalose gene in the control treatment was not observed on a semiquantitative gel but was detected by real-time PCR due to the high sensitivity of this method (Fig. 2B).

The finding of increasing amounts of trehalose agrees with many studies that describe the importance of osmotic adjustment of species, genotypes or cultivars to drought in grasses (El-Bashiti et al. 2005; Hongbo et al. 2006). These authors assert that this adjustment is related to the accumulation of solutes in tissues in response to drought, which maintains cell turgor and facilitates the adjustment of physiological and biochemical processes to such conditions. Thus, plants that are more tolerant to drought generally show higher amounts of trehalose in plant tissue

Recent studies suggest that trehalose in superior plants may be related to carbohydrate accumulation and the protection of cells against damage caused by abiotic stress. It is further believed that trehalose acts as a molecular signal in the regulation of plant metabolism and development (Bae et al. 2005). The identification

of trehalose as a potential osmoprotectant has raised interest in its metabolism as a means of introducing traits of tolerance to abiotic stresses, using genetic transformation, into crops of economic interest. To date, there are no reports on the participation of the trehalose in the expression of water-deficit tolerance in large crops such as sugarcane.

In this study, the set of primers designed to clone trehalose gene *SoT6P* of the sugarcane variety RB 72910 amplified a fragment of cDNA of approximately 540 bp. After sequencing, the identity with other trehalose sequences was verified. The amino acid-deduced sequence showed 95% identity with trehalose of *Saccharum officinarum*, 70% with trehalose of *Saccharomyces cerevisiae*, 68% with trehalose of *Selaginella lepidophylla*, 65% with trehalose of *Arabidopsis thaliana*, 62% with trehalose of *Ginkgo biloba* and 59% with trehalose of *Escherichia coli* (Fig. 3A). A phylogenetic tree was constructed using amino acid sequences deduced from the trehalose gene *SoTPS* and other trehalose types deposited in GenBank. The following two groups were formed: Group I with trehalose of two distinct microorganism types (*S. cerevisiae* and *E. coli*) and three plants (*S. lepidophylla*, *Ginkgo biloba* and *A. thaliana*) and group II with trehalose of sugarcane only (Fig. 3B).

In the sugarcane plants studied here, the expression of the trehalose gene was only verified in plants under more severe stress. A similar result was obtained recently by Wu et al. (2006), who subjected *Ginkgo biloba* plants to different stress types. Furthermore, in cotton plant leaves under water deficit, Kosmas et al. (2006) observed a considerable increase in the expression level of the trehalose gene compared to unstressed plants based on RT-PCR analysis. Studies focusing on the metabolism of trehalose in plants have been conducted particularly with *A. thaliana* (Avonce et al. 2004; Bae et al. 2005). No studies of this nature have been reported so far for sugarcane. The results obtained here reveal the potential of the identified gene for future studies aiming to develop more water deficit-tolerant varieties based on genetic transformation.

Taken together, the present study demonstrates the application of two technologies of SSH and RT-PCR to study differential expression of genes in response to abiotic stress. While SSH could be used for initial isolation of differentially expressed transcripts, a confirmation of gene expression of a gene involved in water stress can be accomplished efficiently by qRT-PCR analysis.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the agencies and companies in Brazil that supported this research project: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa - Programa Macro 3), Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) and Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Table1 Identification of salicylic acid-induced genes in sugarcane RB 72910, with similarity to known genes from *Sacharum officinarum* species.

Clone ¹	Gene description (Access no.) ²	E-value ³
SA-SSH-18	Glutamine Synthase [<i>Sacharum officinarum</i>] gb AY 835457.1	0.0
SA -SSH-30	Acil - CoA synthase [<i>Sacharum officinarum</i>] TC 50035	3-33
SA -SSH-35	Endopeptidase NP1 (precursor) [<i>Sacharum officinarum</i>] TC 4835.1	1.6-62
SA -SSH-53	Peptidyl-polyl cistrans isomerase [<i>Sacharum officinarum</i>] TC 49521	1.6-67
SA -SSH-141	Sucrose-Phosphate Synthase [<i>Sacharum officinarum</i>] TC 49521	2.2-52

¹Genes isolated by suppression subtractive hybridization, from salicylic acid treated sugarcane mRNAs.

²Gene roles were identified with homologue sequences from NCBI, TIRG and DDBJ, using the program BlastX. ³E-value was used to indicate the significance of the similarity for each gene. 0.0 correspond to 100% similarity.

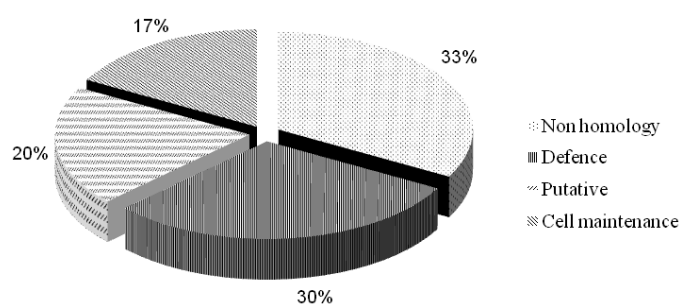


Fig. 1 Genes activated in the sugarcane plants treated with salicylic acid (SA). Genes were isolated by suppression subtractive hybridization, from sugarcane mRNAs, 24 hours after SA treatment.

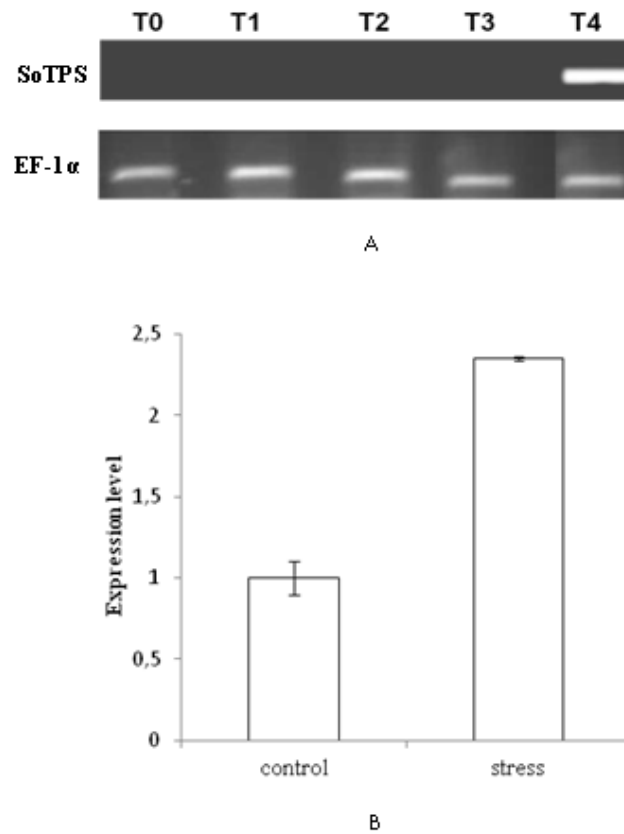


Fig. 2 RT-PCR and Real-time PCR analysis. (A) Gene expression analysis of *SoTPS*. Pattern of RT-PCR expression of gene *SoT6P* analyzed in leaves of sugarcane plants under water stress. T0 - Control, T1 - 50% gravimetric soil moisture, T2 - 40% gravimetric soil moisture, T3 - 20% gravimetric soil moisture and T4 - 10% gravimetric soil moisture. *EF-1α*, expression control. (B) Relative gene expression. Level of trehalose gene expression in RB 72910 sugarcane variety estimated by qPCR. Control (no stress), 100% gravimetric soil moisture; Stress (severe stress), 10% gravimetric soil moisture.

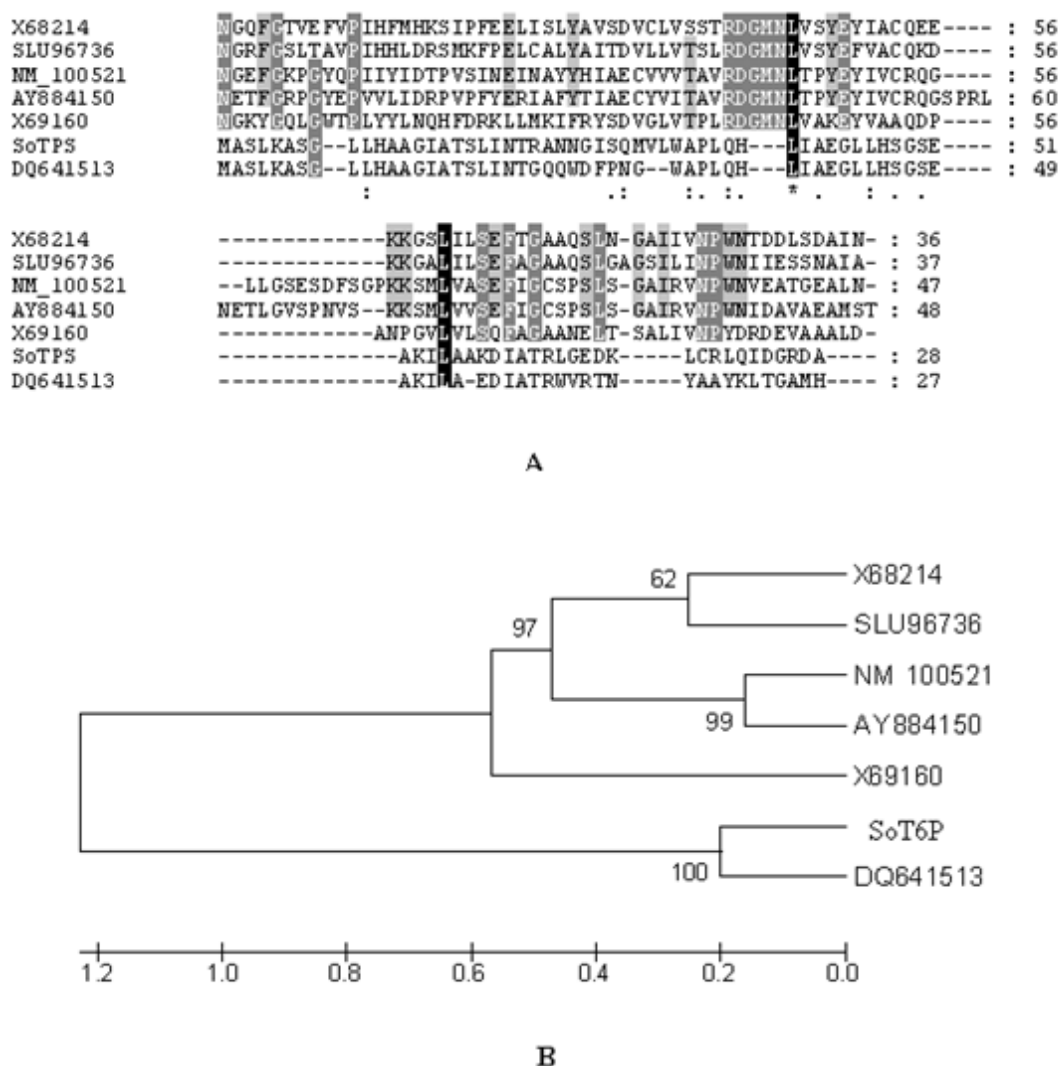


Fig. 3 Alignment of SoTPS sequences with trehalose of different organisms. A- Numbers on the right indicate the number of amino acids of the predicted protein. The sequences marked black dark gray and clear grey represent identical amino acids, 80% and 60% identity, respectively. *S. officinarum* (GenBank, accession no. DQ641513); *S. cerevisiae* (GenBank, accession no. X68214); *A. thaliana* (GenBank, accession no. NM100521); *G. biloba* (GenBank, accession no. AY884150) and *E. coli* (GenBank, accession no. X69160). B- Analysis of the phylogenetic tree of the SoT6P gene with trehalose of different organisms. The amino acid sequences were aligned with Clustal W and edited with Tree-explorer.

References

- Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo JO, Dijck PV, Thevelein JM, Iturriaga, G (2004) The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid and Stress Signaling. *Plant Physiol* 136:3649–3659.
- Amaral DOJ, Lima MMA, Resende LV, SILVA, MV (2008) Differential gene expression, induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection, in tomato. *Pesq agropec bras* 43 (8):000-000.
- An C, Mou Z (2011) Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. *J Integr Plant Biol* 53 (6):412–428.
- Bae H, Herman E, Bailey B, Bae H J, SICHER R (2005) Exogenous trehalose alters *Arabidopsis* transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism and plant defense. *Physiol Plantarum* 125:114–126.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time Reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169-193.
- Castleden CK, Aoki N, Gillespie VJ, Macrae EA, Quick WP, Buchner P, Foyer CH, Furbank RT, Lunn JE. (2004). Evolution and Function of the Sucrose-Phosphate Synthase Gene Families in Wheat and Other Grasses. *Plant Physiol* 135:1753–1764.
- Dean JD, Goodwin PH, Hsiang T (2002) Comparison of Relative RT-PCR and Northern Blot Analyses to Measure Expression of 1,3-Glucanase in *Nicotiana benthamiana* Infected With *Colletotrichum destructivum*. *Plant Mol Biol Rep* 20:347-356.
- El-Bashiti T, Hamamci H, Oktem HA, Yucel M (2005) Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Sci* 169:47-54.
- Fernández P, Paniego N, Lew S, Hopp H.E, Heinz, RA (2003) Differential representation of sunflower ESTs in enriched organspecific cDNA libraries in a small scale sequencing project. *BMC Genomics*, 4:1-9.
- Hayat S, Masood A, Yusuf M, Fariduddin Q, Ahmad A (2009) Growth of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) in response to salicylic acid under high-temperature stress. *Braz J Plant Physiol* 21 (3):187-195.
- Hongbo S, Zongsuo L, Mingan S (2006) Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. *Colloid Surfaces B*, 47 (2):132-139.
- Iordachescu M, IMAI R (2008) Trehalose Biosynthesis in Response to Abiotic Stresses. *J Integr Plant Biol* 50 (10):1223-1229.
- Kosmas SA, Argyrokastritis A, Loukas MG, Eliopoulos E, Tsakas S, Kaltsikes PJ, (2006) Isolation and characterization of drought-related trehalose6-phosphate-

- synthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* 223:329–339.
- Kumar S, Tamura N, Nei M (2004) Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Brief Bioinform* 5:150-163.
- Kürkcüoğlu S, Degenhardt J, Lensing J, Almasri AN, Gau AE (2006). Identification of differentially expressed genes in *Malus domestica* after application of the non-pathogenic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3 to the phyllosphere. *J Exper Bot* 22:1-9.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 25:402-8.
- Mahajan S, Tuteja N, (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochem Bioph* 444 (2):139–158.
- Mahalingam R, Gomez-Buitrago AM, Eckardt N, Shah N, Guevara-Garcia A, Day P, Raina R, Fedoroff NV (2003) Characterization of the stress/defense transcriptome of *Arabidopsis* genome biology. *Genome biol* 4:R20.1-R20.14.
- Moody DE (2001) Genomics techniques: an overview of methods for the study of gene expression. *J Animal Sci* 79:E128-E135.
- Nepomuceno A L, Neumaier N, Farias JRB, Oya T (2002) Expression of heat shock protein and trehalose-6-phosphate synthase homologues induced during water deficit in cotton. *Braz J Plant Physiol* 14 (1):12-18.
- Papini-Terzi FS, Rocha FR, Vêncio RZN, Oliveira KC, Felix JM, Vicentini R, Rocha C, Quirino Simões AC, Ulian EC, Zingaretti Di Mauro SM, Da Silva AM, Bragança Pereira CA, Menossi M, Mendes Souza G (2005) Transcription Profiling of Signal Transduction-Related Genes in Sugarcane Tissues. *DNA Res* 12:27-38.
- Rodríguez M, Canales E, Borrás-Hidalgo O (2005) Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotecnología Aplicada*, 22:1-10.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
- Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39(1):1-11.
- Wu W, Pang Y, Shen G, Lu J, Lin J, Wang J, Xiaofen S., Tang K (2006) Molecular cloning, characterization and expression of a novel trehalose-6-phosphate synthase homologue from *Ginkgo biloba*. *J Biochem Mol Biol* 39(2):158-66.

CAPÍTULO II

DIFFERENTIAL PROTEIN EXPRESSION OF A DROUGHT-TOLERANT SUGARCANE VARIETY, RB72910, IN TO WATER DEFICIT RESPONSE

Differential Protein Expression of a drought-tolerant sugarcane variety, RB72910, in to water deficit response

Clebia M A Almeida^{1,*1}, Tulio D Silva¹, Giovani G Brito², Márcia V Silva³ and Maria Tereza S Correia³

¹Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. CEP: 50670-420, Brasil. Phone/Fax +55(81)2126-8354;

²EMBRAPA Algodão – Núcleo Cerrado, Caixa Postal 179, CEP: 58107-720, Santo Antônio de Goiás - GO, Brasil.

³Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. CEP: 50670-420, Brasil. Phone/Fax +55(81)2126-8354;

Abstract

The alteration of protein synthesis or degradation is one of the fundamental metabolic processes that affects drought tolerance. To investigate the protein profiles of sugarcane exposed to drought stress, two unrelated varieties of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) RB 72910 (tolerant) and RB 943365 (susceptible) were subjected to progressive water stress for 30 days. RB 72910 is a variety without important agronomic traits but it shows high tolerance to drought and can be used as sources of genes to improve sugarcane crop. Two physiological traits were used to quantify the water deficits in sugarcane leaves. The relative water content (RWC) in RB 943365 was decreased to 50% on day 30th whereas the RWC of RB 72910 was slightly decreased and remained constant at 86% upon exposure to the water stress. RB 72910 variety was able to keep their largest values of leaf water potential (Ψ_w) that the RB 943365 variety under water deficit. Protein expression pattern in leaves of two varieties was studied by two-dimensional electrophoresis. Was observed that the expression of 12 proteins had changed after the water deficit-treatment in RB 72910, 8 up-regulated and 4 down-regulated. While in RB 943365 the expression of all proteins decreased. These results indicate that differentially expressed proteins of the tolerant RB 72910, had a high potential for development as markers for drought-tolerant sugarcane cultivars.

Key words: 2D electrophoresis; differentially expressed proteins; *Saccharum officinarum*; water stress

* Corresponding author. Email: clebia.almeida@gmail.com

Introduction

Sugarcane is a major industrial crop cultivated in tropical and sub-tropical regions to produce sugar (Inman-Bamber and Smith 2005). The production of sugarcane is negatively influenced by a vast number of environmental factors that affect growth, metabolism and yield. Of these, the strongest and most frequent negative influence on sugarcane yield in Brazil is drought.

Plants respond to their changing environment in a complex, integrated way that allows them to react to the specific set of conditions and constraints present at a given time (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007) and modify their metabolism through gene expression alterations that vary according to duration and severity of the stress (Bray et al. 2000). Water deficit can affect plants in different ways. In the frame of “physiological window” mild drought induces in plants regulation of water loss and uptake allowing maintenance of their leaf relative water content (RWC) (Yordanov et al. 2003). It induces accumulation of compatible solutes, such as proline, sugar, and betaine in plants (Mahajan and Tuteja 2005). These compounds help plants to adapt to the severe condition by means of specific biochemical functions. Water content and water potential (Ψ_w) have been widely used to quantify the water deficits in leaf tissues (Silva et al. 2008; Brito et al. 2011). Leaf water content is a useful indicator of plant water balance. On the other hand, water potential measures the energetic status of water inside the leaf cells (Colom and Vazzana, 2003).

Protein and secondary metabolites of leaves from variety of plants have been examined and were found to be promising as markers (Jangpromma et al. 2010). Thus, in this study, proteins involved in drought stress from sugarcane leaves, variety RB 72910, were screened by proteomics in order to obtain useful information for future breeding programs.

Material and Methods

Plant material and treatment

Changes in protein expression patterns in response to drought stress were studied, comparing between two different cultivars of sugarcane plants: RB 72910 (drought-tolerant) and RB 943365 (drought-susceptible). They were grown in greenhouse for later examination on drought tolerance. The RB 72910 cultivar was

selected as the drought-tolerant variety, using the criteria gives by Genetic Improvement Program of Sugarcane/RIDESA, Universidade Federal de Alagoas, Brazil, based on physiological and of productivity data in an experimental field context. RB 72910 not shows important agronomic traits but it shows high tolerance to drought conditions and can grow in several type of soil. The representative drought-susceptible cultivar, RB 943365, is a commercial variety cultivated extensively and gives high sugar yield. The two representative cultivars were obtained from Sugarcane Experimental Station of Carpina (EECAC), in the Northeast of Brazil. Sugarcane plants were planted and grown in PVC pots (30 L) filled with mixture of washed sand and Plantmax® substrate in the 1:1 ratio, for 60 days with no water restriction. After this period, water stress was induced by irrigation suppression and the soil water content was measured by gravimetric method. Daily irrigation was maintained in control plants. Water-stressed plants were collected on the 30th d of the experimental treatment, which was designated as severe water deficit conditions (20% soil water content). The experiment was carried out in a greenhouse (29°C and 70% RH). Leaf samples were harvested from stressed and control plants water-stressed treatment. Samples were stored at -80°C.

Measurements of relative water content (RWC) and water potential (Ψ_w)

The excised leaves of sugarcane plants grown under drought or control condition were subject to measurement for leaf relative water content. RWC was determined according to the method of Barrs and Weatherley (1962) based on the following calculation:

$$RWC = [(FW-DW)/(SW-DW)] \times 100$$

Where:

FW = Fresh weight of leaves

DW = Dry weight of leaves after drying at 80°C

SW = The saturated or turgid weight of leaves after soaking in water for 8 h at room temperature

Leaves +1 were used for measurements of water potential. For control plants, leaf predawn water potential as measured periodically with a Scholander-type pressure chamber, was always above -0.2 MPa. The water deficit was allowed to

progress until Ψ_w reached about -4.0 MPa at predawn (30th days of the experimental treatment), when leaves samples were collected for analysis.

Protein extraction for electrophoresis

Five hundred mg of sugarcane leaves were ground to fine powder using liquid nitrogen and suspended in 2 mL lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 2% (w/v) DTT. The homogenate was precipitated for 1 h at -20°C and centrifuged at 10000 × g, 4°C, for 30 min. and then the supernatant was discarded and the pellet was re-suspended with cold acetone containing 0.07% β -mercaptoethanol and kept overnight at -20°C; after that, the pellet was washed twice with cold acetone. The homogenate was centrifuged for 30 min at 10.000 rpm at 4°C. The pellet was resuspended with 80% acetone and kept for 1 h at -20°C, and then it was centrifuged again. Pellets were resuspended in rehydration buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 2 mM DTT, 0.8% (w/v) IPG buffer and 0.2% bromophenol blue. Protein concentration was determined by Bradford (1976) assay using bovine serum albumin as the standard.

Protein analysis by gel electrophoresis

The efficiency of the total protein extraction protocol by lysis buffer solution and methodology of proteins quantification were verified using one-dimensional analysis. One-dimensional sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed in vertical minigels using 15% separating gel and 4% stacking gel. Gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 and photographed. Two-dimensional (2-D) electrophoresis was performed according to a modified method of O'Farrell (1975). For first dimension isoelectric focusing gel, proteins were resuspended in the rehydration buffer. Samples were allowed to rehydrate at least 14 h at 20°C. Proteins (250 μ g) for each sample were loaded onto IPG strip (13 cm, pH 3-10, GE Healthcare Life Sciences). IEF was performed on an IPGphor 3 unit with a cup-loading manifold (GE Healthcare Life Sciences). The second dimension SDS gel used 12.5% acrylamide. The molecular weight standards used was BenchMarkTM Protein Ladder (Invitrogen). Following electrophoresis of the second dimension, proteins were stained with Coomassie brilliant blue R-250. Images of treatment and control gels were normalized through

intensity normalization, and only those proteins with obvious up-regulated expression or significant down-regulated expression and new proteins after treatment were considered to be differentially expressed.

Results e Discussion

Plant responses to water deficit

To study and determine the water-deficit tolerance of sugarcane varieties, 2-month-old RB 72910 and RB 943365 sugarcane plants were drought stressed under non-watering conditions for 30 days. Various degrees of wilting were observed after drought treatment. After stress treatment, the leaves of RB 943365 became wilted and yellow. In contrast, RB 72910 showed normal growth and morphology until the end of experiment. Changes in relative water content (RWC) of plant tissues can well reflect the effects of water stress on plants (Jangpromma et al., 2007). When the RB 72910 and RB 943365 sugarcane varieties were grown in the pots for 3 months, RWC of leaves were measured to be about 91% and 80% respectively. RWC was used to determine drought stress condition. Figure 1 showed that at the day start, no significant different in RWC of both sugarcane varieties. However, after 10 days, the morphology change, wilting showed in RB 943365. The RWC of stressed RB 943365 reduced to 60%. At 30 days, the RWC of stressed plants of RB 943365 considerably decreases to 50%, whereas stressed RB 72910 still maintains about 80% RWC. Rodrigues et al. (2011), studied sugarcane plants (cv. SP83-2847) under during water deficit and observed that RWC decreased from 87% to 64% under severe stress (22% gravimetric soil moisture). Moreover, the leaves of stressed RB 943365 shows obvious wilted comparing to leaves of RB 72910. RB 72910 variety was able to keep their largest values Ψ_w that the RB 943365 variety under water deficit (Figure 2). Thus, leaf predawn water potential was effective in distinguishing the varieties of sugarcane to water stress can be considered a useful tool to characterize genotypes in relation to this stress.

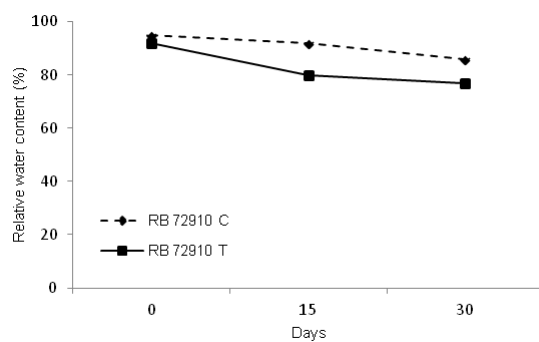
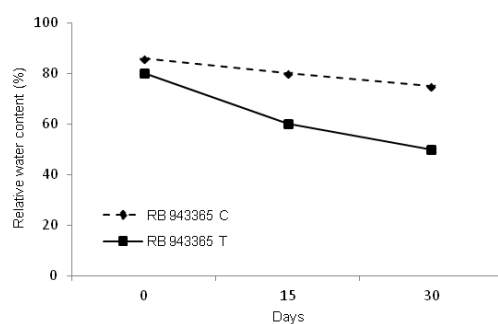
**a****b**

Figure 1. Effect of water stress on relative water content (RWC) of sugarcane leaves. (a) Relative water content of RB 72910 C (control) and RB 72910 T (treated). (b) Relative water content of RB 943365 C (control) and RB 943365 (treated).

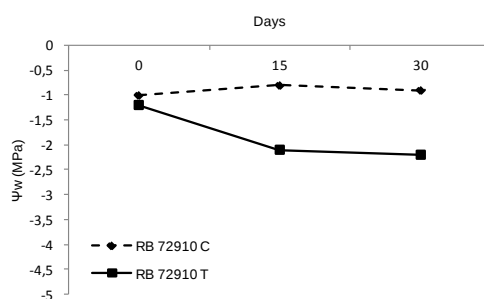
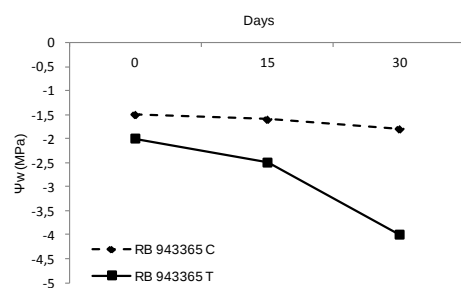
**a****b**

Figure 2. Leaf water potential in sugarcane varieties under to water regimes at 0, 15 and 30 days after treatment establishment. (a) RB 72910 C (control) and RB 72910 T (treated). (b) RB 943365 C (control) and RB 943365 (treated).

Comparison of protein expression patterns of RB 72910 and RB 943365 under water deficit

The general characterization of the proteome to identify the largest possible number of proteins or the proteins differentially expressed between samples in contrasting situations is one of the procedures commonly used in proteomics (Park, 2004). Separation of proteins by two-dimensional electrophoresis is advantageous as it gives an overview of the proteome of a given tissue or cell and allows the pre-separation of proteins by isoelectric point (pI) and molecular mass. By the application of IPG strip (pH 3–10), the result showed that the whole protein from sugarcane mainly concentrated between subacidity isoelectric points and neutrality, while there were only few extremely acidic proteins with isoelectric points below 4 and basic proteins with isoelectric points above 8 (Figure 3). From the comparison of protein 2-DE atlas of highly tolerant variety RB 72910 and highly susceptible variety RB 943365 before and after water- deficit treatment, we could see that the protein expression between resistant and susceptible sugarcane varieties presented some difference, which was the protein expression of the same variety before and after treatment and the protein expression between tolerant and susceptible varieties were different. The difference appeared not only in the expression capacity of the same protein but also in totally inhibited (absent) proteins. At the same time, the quantity and spatial distribution of differential proteins in resistant and susceptible varieties were different, which indicated different molecular responses to water deficit. It indicated that the expression of proteins was regulated by different function modes, which resulted in the tolerance of tolerant variety or the susceptibility of susceptible variety to drought. In the present study, it was observed that the expression of some proteins, in RB 72910 and in RB 943365, had changed after the water deficit-treatment. Among these proteins, the expression amount of seven proteins increased (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9) and the expression of the three proteins (2, 8 and 10) decreased after treatment in RB 72910 (Figure 3). While in RB 943365 the expression of all proteins decreased.

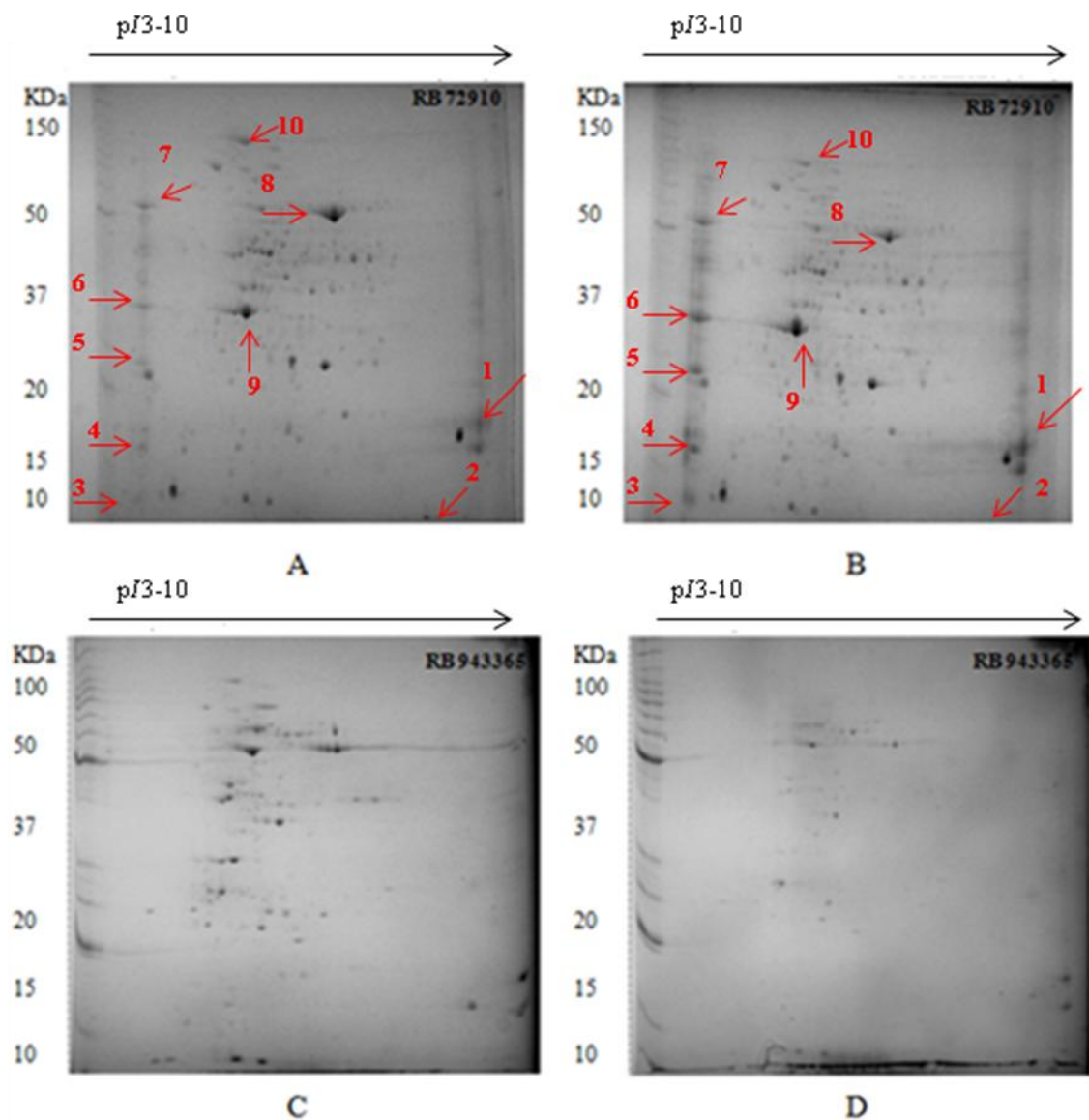


Figure 3. Protein patterns in sugarcane leaves exposed to 30 days of drought stress. Proteins were extracted from leaves, separated by 2D-PAGE. In the first dimension (IEF), 250 μ g of protein was loaded on a 13 cm IPG strip with a linear gradient of pH 3-10. The second dimension (SDS-PAGE), 12.5 % polyacrylamide gel was used. Proteins were visualized by Coomassie brilliant blue R-250. The positions of differentially expressed proteins are indicated by arrowhead. A. Control RB 72910; B. Drought-stressed RB 72910; C. Control RB 943365; D. Drought-stressed RB 943365.

In conclusion, under water stress conditions, the leaves of RB 943365 sugarcane line wilted and turned yellow. In contrast to RB 72910 showed normal growth when compared to the control. Relative water content (RWC) in the leaves of stressed RB 943365 decreased from 80% to 50% in 30 days, while it stayed at 80 % in those of the controls. This stress can be considered quite severe for sugarcane plants, since RWC of leaf lower than 70% is known to induce marked damages. In RB 72910 leaves, RWC decreased slightly and remained constant at 85% in both controlled and stressed plants. These results indicated that RB 72910 was more tolerant to water stress than RB 943365. Furthermore, the protein expression pattern of the tolerant and susceptible varieties was contrasting, indicating that the differentially expressed proteins may be related to water stress. Thus, the RB 72910 has a high potential for identification of candidates proteins which could be useful for future studies aiming at more water deficit tolerant varieties based on genetic transformation.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the agencies and companies in Brazil that supported this research project: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa - Programa Macro 3), Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) and Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

References

- Barrs HD, Weatherley PE (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust J Biol Sci* 15:413-428
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. - In: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (ed.): *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Pp 1158-1203. American Society of Plant Physiologists, Rockville
- Brito GG, Sofiatti V, Lima MMA, Carvalho LP, Silva Filho JL (2011) Physiological traits for drought phenotyping in cotton. *Acta Sci Agron* 33 (1): 117-125
- Colom MR, Vazzana C (2003) Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought sensitive weeping lovegrass plants. *Environ Exp Bot* 49:135-144
- Ingram J and Bartels D (1996) The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:377-403
- Inman-Bamber NG and Smith DM (2005) Water Relations in Sugarcane and Response to Water Deficits. *Field Crops Res* 92:185-202
- Jangpromma N, Kitthaisong S, Daduang S, Jaisil P, Thammasirirak S (2007) 18kDa Protein accumulation in sugarcane leaves under drought stress conditions. *KMITL Sci. Tech. J.* 7 No. S1.
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold: Salinity and drought stresses: An overview. *Arch Biochem Biophys* 444: 139–158.
- O'Farrell PH (1975) High Resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins. *J Biol Chem* 250(10):4007-4021
- Park O K (2004) Proteomic Studies in Plants. *J Biochem Mol Biol* 37(1):133-138
- Rodrigues FA, Da Graça JP, De Laia ML, Nhani-JR A, Galbiati JA, Ferro MIT, Ferro JA, Zingaretti SM (2011) Sugarcane genes differentially expressed during water deficit. *Biol Plant* 55 (1):43-53
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* 58: 221-227
- Silva MA, Silva JAG, Enciso J, Sharma V, Jifon J (2008) Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. *Sci Agri* 65: 620-627
- Yordanov I, Velikova V, Tsonev T (2003) Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg J Plant Physiol*, special issue: 187-206

CAPÍTULO III

IDENTIFICATION OF UP-REGULATED PROTEINS IN TOLERANT SUGARCANE PLANTS UNDER WATER DEFICIT

Identification of up-regulated proteins in tolerant sugarcane plants under water deficit

Clebia M A Almeida^{*,2}, Tulio D Silva¹, Márcia V Silva² and Maria Tereza S Correia²

¹Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. CEP: 50670-420, Brasil. Phone/Fax +55(81)2126-8354;

²Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. CEP: 50670-420, Brasil. Phone/Fax +55(81)2126-8354.

Abstract

Water stress-related proteins in three sugarcane varieties were identified using proteomics approach based on two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Sugarcane plants were grown in greenhouse and water stress was induced by irrigation suppression and the soil water content was measured by gravimetric method. Total proteins were extracted from leaves, and separated by 2-DE. Some typical spots exhibited significant changes in stress treatment compared to control, which were identified using MALDI-TOF-MS successfully. Bioinformatics analysis revealed that the functions of the 15 differential proteins, in the three varieties, were associated with such functions as photosynthesis, signal transduction, and adaption to environmental adaptation. These results provide insight into the part of regulatory mechanism of adaptations to water deficit through differential expression of specific proteins.

Keywords: Bidimensional electrophoresis, differential expression, proteins, water deficit

* Corresponding author. Email: clebia.almeida@gmail.com

Introduction

Plants are often subjected to osmotic stress, such as drought, cold and salinity under natural conditions. These stresses cause osmotic changes in the cellular milieu which led to the disruption in normal cellular activities, severely affected plant growth and development, or even cause plant death, thus reduce crop productivity (Zhou et al. 2011). Sugarcane is the most important sugar crop and is also one of the most regenerative energy crops cultivated in tropical and sub-tropical regions. Drought is one amongst the major stresses limiting sugarcane and sugar productivity (Sugiharto et al. 2004; Prabu et al. 2011). It is well known that the water deficit condition is likely to induce functional gene expressions changes in plants to protect themselves against desiccation (Stolf-Moreira et al. 2011; Zhang et al. 2011). Determination of gene function requires the identification of encoded proteins by proteomics (Abbasi and Komatsu 2004). It is of great importance to investigate the stress response at the protein level. Proteomic approaches provide powerful tools for a systemic study of proteins under stress conditions in plant (Cánovas et. al. 2004; Cho et al. 2010). Two-dimensional electrophoresis (2-DE) is one of the most efficient strategies to study the differential expression proteins in plant (Agrawal et al. 2009; Ding et al. 2011). Many recent proteomic studies have been performed on various species under different abiotic stresses, but to our knowledge, there were only a few proteomic studies in sugarcane (Sugiharto et al. 2002; Amalraj et al. 2010; Jangpromma et al. 2010). The aim of the present work was to identify water deficit related proteins in three tolerant sugarcane plants through a comparative study using proteomics approach based on 2-DE and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS).

Material and methods

Plant Material and growth conditions

Sugarcane plants, variety RB 72910, RB 931011 and RB 867515, were planted and grown in PVC pots (30 L) filled with mixture of washed sand and Plantmax® substrate in the 1:1 ratio, for 60 days with no water restriction. After this period, water stress was induced by irrigation suppression and the soil water content was measured by gravimetric method where, 80% gravimetric soil moisture was considered the control treatment and 20% (severe stress). Daily irrigation was maintained in control plants. Water-stressed plants were collected on the 30th day of the experimental treatment (20% soil water content). The experiment was carried out in a greenhouse (29°C and 70% RH). Leaf samples were harvested from stressed and control plants. Samples were stored at -80°C for protein extraction.

Protein extraction for electrophoresis

Sugarcane leaves (0.5 g) were ground to fine powder using liquid nitrogen and suspended in lysis buffer, which contain 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 2% and (w/v) dithiothreitol (DTT). The homogenate was precipitated for 2 h at -20°C and centrifuged for 30 min at 10.000 rpm at 4°C, and then the supernatant was discarded and the pellet was re-suspended with ice-cold acetone containing 0.07% β -mercaptoethanol and kept overnight at -20°C; after that, the pellet was washed twice with ice-cold acetone. The homogenate was centrifuged for 30 min at 10.000 g at 4°C. The pellet was resuspended with 80% acetone and kept for 1 h at -20°C, and then it was centrifuged again. Finally, the pellet was dried into powder by vacuum drying at low temperature and stored at -80°C until use. Pellets were resuspended in rehydration buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 2 mM DTT, 0.8% (w/v) IPG buffer and 0.2% bromophenol blue. Protein concentration was determined by Bradford (1976) assay using bovine serum albumin as the standard.

Protein analysis by gel electrophoresis

The efficiency of the total protein extraction protocol by lysis buffer solution and methodology of proteins quantification were verified using one-dimensional

analysis. One-dimensional sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed in vertical minigels using 15% separating gel and 4% stacking gel. Gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 and photographed. Two-dimensional (2-DE) electrophoresis was performed according to a modified method of O'Farrell (1975). For first dimension isoelectric focusing gel, proteins were resuspended in the rehydration buffer (8 M urea, 0.5% (w/v) CHAPS, 0.2% (w/v) DTT, 0.5% (v/v) IPG Buffer, 0.002% bromophenol blue). Samples were allowed to rehydrate at least 14 h at 20°C. Proteins (250 µg) for each sample were loaded onto IPG strip (13 cm, pH 3-10, GE Healthcare Life Sciences). IEF was performed on an IPGphor 3 unit with a cup-loading manifold (GE Healthcare Life Sciences). The second dimension SDS gel used 12.5% acrylamide. The molecular weight standards used was BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen). Following electrophoresis of the second dimension, proteins were stained with Coomassie brilliant blue R-250. Images of treatment and control gels were normalized through intensity normalization, and only those proteins with obvious up-regulated expression or significant down-regulated expression and new proteins after infection were considered to be differentially expressed.

Results and Discussion

To investigate the water-deficit tolerance response of sugarcane varieties, 60-days-old sugarcane plants were drought stressed under non-watering conditions for 30 days. In this time, the soil water content corresponded to approximately 20 % gravimetric soil moisture that is considered severe stress (Queiroz et al. 2011; Rodrigues et al. 2011). Analysis of differentially expressed proteins of the three studied varieties revealed changes in protein content in sugarcane leaves after stress treatment. Figure 1 shows the Coomassie-stained 2-DE gel images of proteins from sugarcane leaves in the control and the stress treatment. Most spots covered the sub-regions of pI of about 4.0–6.8 and their MW ranged from 15.0 to 80.0 kDa. Comparison of the protein profiles revealed clear differences in intensity of a number of spots amongst control and stress treatment. Quantitative analysis revealed significant changes in intensities of about 53 proteins spots, which were either up- or down-regulated (Fig. 2). Three typical regions (one to each variety) have been highlighted and designated as 32, 33, 34, 40, 41; 43, 44, 45, 49; 68a, 68b, 68c; 70a,

70b and 70c in Fig. 1. The protein spots were selected for statistical analysis of the relative expression abundance which was calculated by the ratio of the volume of the spot under stress treatment and control. Table 1 listed the differentially expressed proteins identified by the MALDI-TOF-MS. In this table only up-regulated proteins in stress treatment are presented. Analysis demonstrated that the functions of these proteins were associated with such functions as photosynthesis, signal transduction and regulations process.

Gene expression alterations can promote cellular adaptation to water stress. The gene expression profile characterized in a molecular study suggests the complexity of defence mechanisms (Zheng et al. 2004). Physiological modifications are the first responses of the plants to water deficit. The plant response begins with stress recognition at the cellular level *via* activation of signal transduction pathways. The roots signal to leaves through messengers, promoting stomatal closure, leaf rolling and leaf abscission (Rodrigues et al. 2011). Furthermore, water stress can severely reduce the productivity of sugarcane (Silva et al. 2008) because the photosynthetic rate reduces progressively as stress becomes more severe (Bhatt et al. 2009; Santos et al. 2009). On the other hand, it induces accumulation of compatible solutes, such as trehalose, in plants (Mahajan and Tuteja 2005). In these tolerant sugarcane varieties several genes related to photosynthesis and trehalose synthesis were induced under stress (Table 1). Our results showed up-regulation of chloroplastic ATP synthase delta chain protein in sugarcane leaves under water deficit stress, ATP synthase is highly correlated with the energy metabolism (Lefebvre-Legendre et al. 2001). Various stresses affect the expression of ATP synthase proteins. ATP synthase was up-regulated under cold stress in rice (Cui et al. 2005). The CF1 alpha chain of ATP synthase was also found up-regulated under heat stress (Lee et al. 2007); however, its down-regulation was recorded in wheat by Caruso et al. (2009). Jangpromma et al. (2010) reported that ATP synthase CF1 beta chain and ATP synthase alpha chain was up-regulated under natural soil drought conditions in sugarcane. These results indicated that ATP synthase is the protein which responds to abiotic stress. However, the differential expression of ATP synthase delta chain protein and its involvement in drought stress have not been reported yet (Zhou et al. 2011).

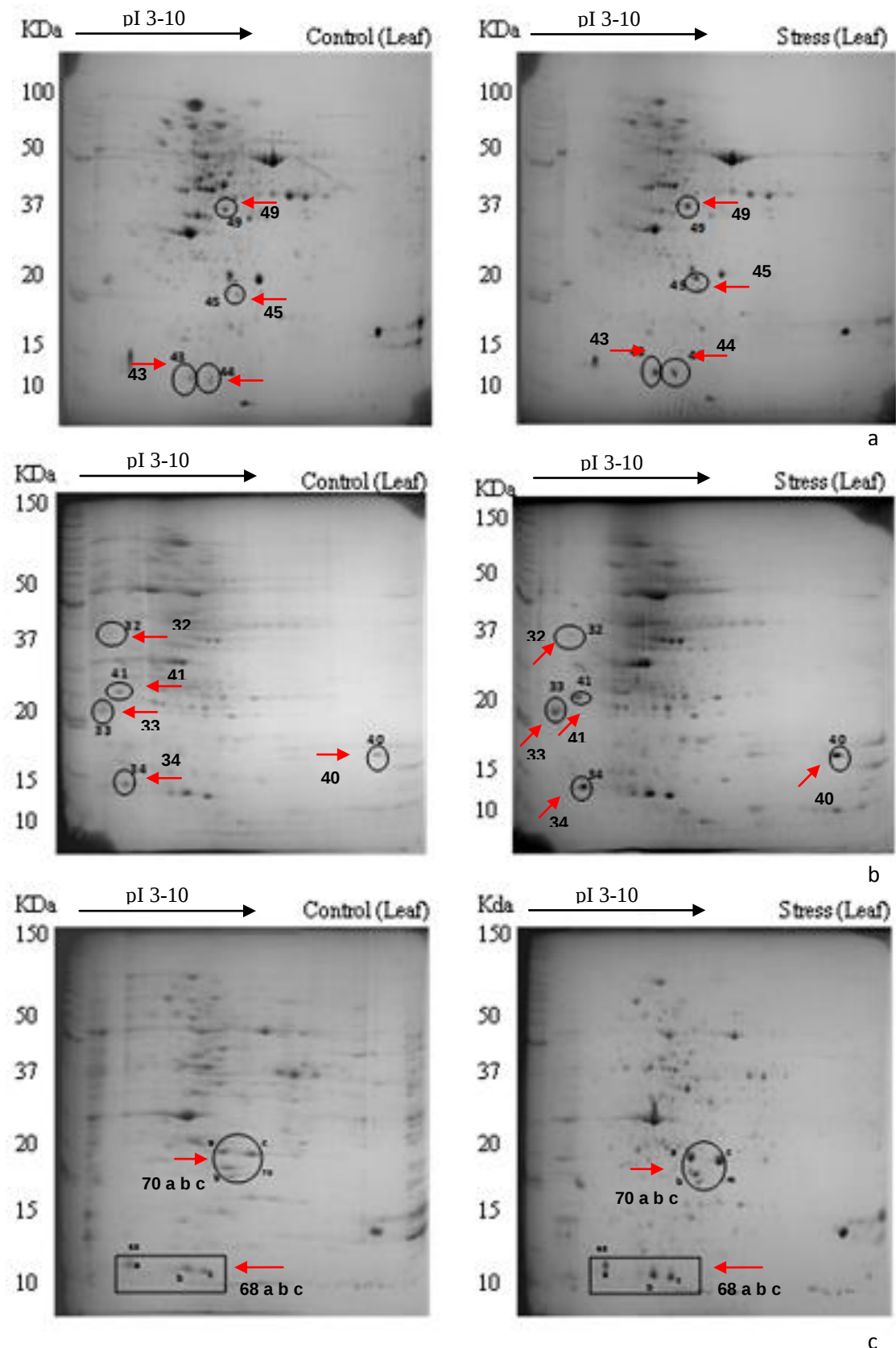
Sugars are the main carbon and energy source for cellular metabolism, but, in addition, play pivotal regulatory roles in growth and development. Trehalose is a rare

sugar with unique abilities to protect biomolecules from environmental stresses and is present in many bacteria, fungi and some desiccation-tolerant higher plants. Increasing trehalose accumulation in crop plants could improve drought and salinity tolerance (Penna 2003; Vandesteene et al. 2010). The identification of trehalose metabolizing enzymes under abiotic stress conditions was found in several studies (Nepomuceno et al. 2002; Penna 2003; El-Bashiti 2005). In this study was found up-regulated trehalose-6-phosphate synthase in two sugarcane varieties (RB 931011 and RB 72910).

This study describes genes induced in sugarcane, variety RB 72910, RB 931011 and RB 867515, exposed to severe drought conditions. Genes induced by water stress included the signalling molecules, genes responsive to stress, regulated by plant hormones, and genes important for protection against oxidative stress. The study of gene expression patterns in plants with different responses to water stress is an alternative method for identifying tolerance genes in order to assist breeding programs.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the agencies and companies in Brazil that supported this research project: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa - Programa Macro 3), Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) and Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).



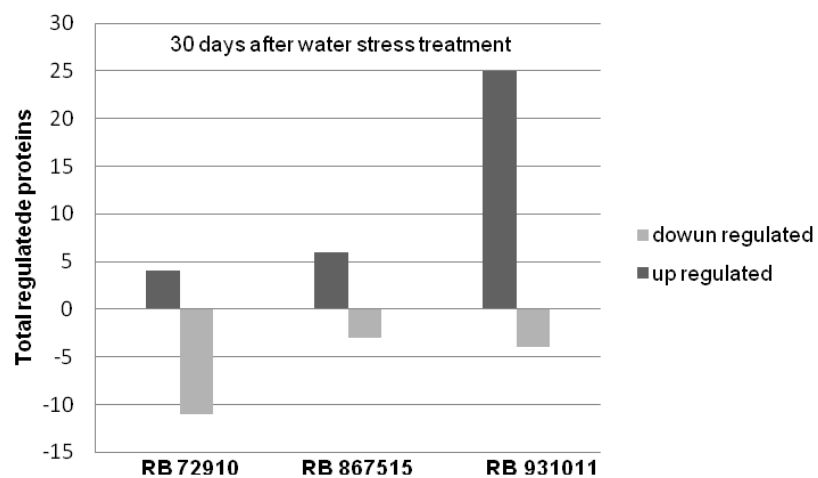


Fig. 2 Comparison of up- and down-regulated spots in tolerant sugarcane varieties under water deficit condition.

Table 1 Proteins differentially expressed up regulated in stress treatment in sugarcane under water deficit identified by two-dimensional difference gel electrophoresis (2-DE) followed by mass spectrometry (MS).

Spot	NCBI Accession no.	Homologous protein	Species	E value	Sugarcane* variety
32	ABX26126.1	chloroplast acetolactate synthase	<i>Saccharum officinarum</i>	0.45	RB 931011
33	NP_189218.1	ethylene-responsive transcription factor ERF119	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.049	RB 931011
34	AEL95439.1	early-responsive to dehydration-related protein	<i>Populus euphratica</i>	0.050	RB 931011
40	ACE79167.1	trehalose-6-phosphate synthase 2	<i>Saccharum officinarum</i>	0.072	RB 931011
41	XP_002963223.1	ATP-binding cassette transporter	<i>Selaginella moellendorffii</i>	0.27	RB 931011
43	NP_683557.1	ubiquitin-conjugating enzyme family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.021	RB 72910
44	ADL70856.1	indole-3-acetic acid inducible 34	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.083	RB 72910
45	ABU85448.1	NADH-plastoquinone oxidoreductase	<i>Musa acuminata</i>	0.32	RB 72910
49	AEL98992.1	putative alpha,alpha-trehalose- phosphate synthase	<i>Silene latifolia</i>	1099	RB 72910
68a	YP_001531224.1	photosystem I assembly protein ycf4	<i>Cuscuta obtusiflora</i>	0.12	RB 867515
68b	BAD16347.1	leaf senescence protein-like	<i>Oryza sativa</i>	0.045	RB 867515
68c	BAK61871.1	cytokinin oxidase	<i>Citrus unshiu</i>	0.18	RB 867515
70a	AEA38256.1	NADH dehydrogenase subunit F	<i>Bonnetia tepuiensis</i>	0.27	RB 867515
70b	BAD94908.1	methionine aminopeptidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.39	RB 867515
70c	BAA97141.1	Ca ²⁺ -transporting ATPase-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.55	RB 867515

*Sugarcane varieties using in the study

References

- Abbasi FM, Komatsu S (2004) A proteomic approach to analyse salt responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics* 4:2072–208
- Agrawal GK, Jwa NS, Rakwal R (2009) Rice proteomics: ending phase I and the beginning of phase II. *Proteomics* 9:935–963
- Amalraj RS, Selvaraj N, Veluswamy GK, Ramanujan RP, Muthurajan R, Palaniyandi M, Agrawal GK, Rakwal R, Viswanathan R (2010) Sugarcane proteomics: establishment of a protein extraction method for 2-DE in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map. *Electrophoresis* 31:1959–1974
- Cánovas FM, Dumas-Gaudot E, Recorbet G, Jorin J, Mock HP and Rossignol M (2004) Plant proteome analysis. *Proteomics* 4:285–298
- Caruso G, Cavaliere C, Foglia P, Gubbiotti R, Samperi R, Laganà A (2009) Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Sci* 177:570–576
- Cho WK, Chen XY, Rim Y, Chu H, Jo Y, Kim S, Park ZY, Kim JY (2010) Extended latex proteome analysis deciphers additional roles of the lettuce laticifer. *Plant biotechnol Rep* 4:311–319
- Cui SX, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng YS, Liu JY (2005) A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics* 5:3162–3172
- Ding C, You J, Liu Z, Rehmani MIA, Wang S, Li G, Wang Q, Ding Y (2011) Proteomic analysis of low nitrogen stress-responsive proteins in roots of rice. *Plant Mol Biol Rep* 29:618–625
- El-Bashiti T, Hamamci H, Öktem HA, Yücel M (2005) Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Sci* 169: 47-54
- Jangpromma N, Kitthaisong S, Lomthaisong K, Daduang S, Jaisil P, Thammasirirak I (2010) A proteomics analysis of drought stress responsive proteins as biomarker for drought-tolerant sugarcane cultivars. *Am J Biochem Biotechnol* 6:89–102
- Lee DG, Ahsan N, Lee SH, Kang KY, Bahk JD, Lee IJ, Lee BH (2007) A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics* 7:3369–3383
- Lefebvre-Legendre L, Vaillier J, Ben Habelhak H, Velours J, Slonimski PP, di Rago JP (2001) Identification of a nuclear gene (FMC1) required for the assembly/stability of yeast mitochondrial F1 ATPase in heat stress conditions. *J Biol Chem* 276:6789–6796
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold: Salinity and drought stresses: An overview. *Arch Biochem Biophys* 444: 139–158

- Nepomuceno AL, Neumaier N, Farias JR. B, Oya T (2002) Expression of heat shock protein and trehalose-6-phosphate synthase homologues induced during water deficit in cotton. *Braz J. Plant Physiol* 14(1): 12-18
- O'Farrell PH (1975) High Resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins. *J Biol Chem* 250(10): 4007-4021
- Penna S (2003) Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends Plant Sci* 8(8): 355-357
- Prabu GR, Kavar PG, Pagariya MC, Theertha Prasad D (2011) Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. *Plant Mol Biol Rep* 29:291–304
- Queiroz RJB, Santos DMM, Ferraudo AS, Carlin SD, Silva MA (2011) Biochemical and physiological responses of sugarcane cultivars to soil water deficiencies. *Sci agric* 68(4):469-476
- Rodrigues FA, Da Graça JP, De Laia ML, Nhani-JR A, Galbiati JA, Ferro MIT, Ferro JA, Zingaretti SM (2011) Sugarcane genes differentially expressed during water deficit. *Biol Plant* 55(1): 43-53
- Silva MA, Silva JAG, Enciso J, Sharma V, Jifon J (2008) Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. *Sci Agri* 65: 620-627
- Sugiharto B (2004) Biochemical and molecular studies on sucrose-phosphate synthase and drought inducible-protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Journal ILMU* 5: 62-67.
- Stolf-Moreira R, Lemos EGM, Carareto-Alves L, Marcondes J, Pereira SS, Rolla AAP, Pereira RM, Neumaier N, Binneck E, Abdelnoor RV, Oliveira MCN, Marcelino FC, Farias JRB, Nepomuceno AL (2011) Transcriptional profiles of roots of different soybean genotypes subjected to drought stress. *Plant Mol Biol Rep* 29:19–34
- Vandesteene L, Ramonb M, Le Royc K, Dijckd PV and Rollanda F (2010) A Single Active Trehalose-6-P Synthase (TPS) and a Family of Putative Regulatory TPS-Like Proteins in Arabidopsis. *Mol Plant* 3(2): 406-419
- Zhang X, Zhen JB, Li ZH, Kang DM, Yang YM, Kong J, Hua JP (2011) Expression profile of early responsive genes under salt stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Mol Biol Rep* 29:626–637
- Zheng J, Zhao J, Tao Y, Wang JH, Liu YJ, Fu JJ, Jin Y, Peng Gao P, Zhang JP, Bai YF, Wang GY (2004) Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray; *Plant Mol Biol* 55: 807-823

Zhou G, Yang LT, Li YR, Zou CL, Huang LP, Qiu LH, Huang X and Srivastava MK (2011) Proteomic Analysis of Osmotic Stress-Responsive Proteins in Sugarcane Leaves. *Plant Mol Biol Rep* 27:185–188

5. CONCLUSÕES GERAIS

A aplicação das técnicas de SSH e qRT-PCR foram úteis no estudo da expressão diferencial de genes em resposta a estresses abióticos;

A análise de géis bidimensionais revelou que a variedade RB 72910 (tolerante) exibiu um perfil protéico contrastante das plantas tratadas, em relação a variedade RB 843365 (sensível). indicando que as proteínas diferencialmente expressas podem estar relacionadas ao déficit hídrico;

Na proteômica, a enzima trealose-6-fosfato, encontradas com expressão aumentada em duas variedades (RB 72910 e RB 931011), pode estar relacionada à resposta da planta ao déficit hídrico completando os resultados observados nas análises por PCR quantitativo.