

Análise da expressão gênica em cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico utilizando a técnica de macroarranjo de cDNA¹

Gene expression analysis in sugarcane submitted to water stress using the cDNA macroarray technique¹

Daniele Fernanda Jovino GIMENEZ², Fabrício Edgar de MORAES², Marcelo Luis LAIA², Karina Maia DABBAS², Roberto Willians NODA², João SUZUKI², Sonia Marli ZINGARETTE³, Maria Inês Tiraboschi FERRO²

¹ Parte da dissertação de Daniele Fernanda Jovino Gimenez

² Departamento de Tecnologia, FCAV-UNESP-Jaboticabal-SP-Brasil, e-mail:dani.jovino@yahoo.com.br, * Autor para Correspondência

³ Biotecnologia, UNAERP-Ribeirão Preto-SP-Brasil

Resumo

Sob condições de estresse hídrico podem ocorrer mudanças fisiológicas e bioquímicas, tais como diminuição nas atividades fotoquímicas, redução da fixação de CO₂ e acúmulo de osmólitos e osmoprotetores. A técnica de macroarranjos de cDNA foi empregada com o objetivo de identificar o padrão de expressão gênica da cultivar de cana-de-açúcar SP80-3280 submetida ao estresse hídrico nos dias 5, 9, 13 e 17 após o início da condição de supressão de água, sendo considerado o dia 1 como controle. Foi observado que a maior porcentagem das proteínas expressas nos dias de estresse hídrico analisados pertence à categoria de bioenergética. Apesar de a planta estar em regime de redução de açúcares disponíveis, o estado de indução observado nas enzimas sacarose fosfato sintase (SFS), sacarose fosfato fosfatase (SFF) e invertase (INV) evidenciam a função das mesmas nos mecanismos de entrada e redistribuição interna dos açúcares nas células. Por outro lado, utilizando a técnica de macroarranjo de cDNA, verificou-se a indução das enzimas trealose fosfato sintase (TFS) e trealose fosfato fosfatase (TFF) tendo como consequência a produção de trealose provocando a inibição da enzima hexoquinase (HXQ) a principal enzima da via glicolítica. Esses resultados condizem com o estado de estresse hídrico em que a planta se encontra, restringindo o rendimento fotossintético e sinalizando aos tecidos meristemáticos uma redução na atividade de crescimento.

Palavras-chave adicionais: sacarose fosfato sintase; sacarose fosfato fosfatase; invertase; hexoquinas; trealose fosfato sintase; trealose fosfato fosfatase.

Abstract

Under water stress conditions, physiological and biochemical modifications may occur, as a reduction in photochemical activities, reduction in CO₂ fixation and accumulation of osmolites and osmoprotectors. The cDNA macroarray technique was used to identify the gene expression pattern of sugarcane (cultivar SP80-3280), submitted to water stress at 5, 9, 13 and 17 days after the beginning of water suppression condition, considering the day 1 as a control. The largest percentage of expressed proteins in the hydric stress days belong to bioenergetic category. Despite the plant be in reduction of available sugars process, the induction of enzymes sucrose phosphate synthase (SPS), sucrose phosphate phosphatase (SPP) and invertase (INV) evidence the function of these enzymes on the mechanism to sugars absorption and redistribution in cells. For the other hand, using the cDNA macroarray technique, was observed the induction of enzymes trehalose phosphate synthase (TPS) and trehalose phosphate phosphatase (TPP), which indicated that had a trehalose production, causing the inhibition of hexokinase (HXQ), the most important enzyme of glycolytic pathway. These results agree with the water stress condition wherein the plants were submitted, reducing the photosynthetic yield and signaling a reduction in growth activity.

Additional keywords: sucrose phosphate synthase; sucrose phosphate phosphatase; invertase; hexokinase trehalose phosphate synthase; trehalose phosphate phosphatase.

Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é espécie alógama pertencente à família Gramineae (Poaceae) do gênero *Saccharum* originária do Sudeste Asiático, na grande região central da Nova

Guiné e Indonésia (DANIELS & ROACH, 1987). É considerada uma das mais importantes culturas em muitos países (INGELBRECHT et al., 1999) principalmente para o Brasil, sendo considerado o maior produtor mundial, devido a sua aplicação industrial

na produção de etanol, um biocombustível renovável e menos poluente, açúcar e outros diversos subprodutos (MENOSSI et al., 2008).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido por Índia, Tailândia e Austrália. As regiões de cultivo são Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste, permitindo duas safras por ano. Para a safra de 2011/2012, a área de cana-de-açúcar colhida destinada à atividade sucroalcooleira está estimada em 8.442,8 mil hectares, distribuída em todos estados produtores (CONAB, 2011). No centro-sul do Brasil, a moagem de cana-de-açúcar da safra 2011/2012 atingiu 134,6 milhões de toneladas no acumulado do início da safra até a segunda quinzena de junho, volume 23 % inferior ao registrado em igual período do ano passado (UNICA, 2011).

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

A desidratação causa mudanças fisiológicas e bioquímicas nas plantas, tais como diminuição nas atividades fotoquímicas, redução da fixação de CO₂, acúmulo de osmólitos e osmoprotetores e alteração no metabolismo de carboidratos (LIU & BAIRD, 2003).

O total de carbono assimilado na fotossíntese é usualmente mais do que a metade despendida no processo de respiração necessária para o crescimento e manutenção, mas esse balanço pode mudar sob condições de estresse hídrico. Muito embora a fotossíntese possa ser reduzida em até 100 % sob condições drásticas de falta d'água, a taxa de respiração pode aumentar ou diminuir sob o estresse, mas nunca se tornar totalmente paralisada (FLEXAS et al., 2005).

Apesar de que o metabolismo de açúcares em plantas submetidas ao estresse hídrico ainda permaneça como uma questão em aberto, existem alguns fatos que têm sido confirmados, quais sejam, os danos sofridos pelos cloroplastos devido ao estresse oxidativo imposto pela desarmonia entre a quantidade de energia luminosa absorvida e a produção líquida de açúcares pela fotossíntese (MUNNÉ-BOSCH et al., 2001; KRIEGER-LISZKAY, 2004), que se encontra limitada pela baixa disponibilidade de CO₂ foliar devido a sua menor condutância nos tecidos foliares (WARREN & DREYER, 2006), como também devido ao maior fechamento dos estômatos em resposta ao déficit hídrico (LAWLOR, 2002). Nessas condições, desenvolve-se uma estreita correlação entre déficit hídrico e metabolismo de açúcares (FLEXAS et al., 2006), que se reflete sobre o complexo de sinalização celular controlado pelos próprios açúcares e que exercem um controle permanente sobre os processos de trans-

dução de sinais e da transcrição em plantas (PRICE et al., 2004), induzindo a uma sinalização que promove maior rigidez sobre todas as atividades de crescimento da planta (GIBSON, 2005). Todos estes efeitos recaem, primariamente, sobre as regiões meristemáticas, cujas células iniciam um processo de ajuste em todas as vias metabólicas dos açúcares, envolvendo essencialmente o dissacarídeo trealose e a regulação nas atividades da enzima hexoquinase (FRANCIS & HALFORD, 2006), com algumas evidências sobre o envolvimento da proteína quinase SnRK1 como sinalizadora dos açúcares em plantas e que apresenta alta homologia com a proteína SNF1 das leveduras (PIEN et al., 2001).

Dois aspectos fundamentais são abordados no presente trabalho, quais sejam, o de evidenciar uma cascata de ativação e de expressão gênica sincronizada com a evolução da progressiva restrição da água disponível a nível celular e da sua avaliação em tecidos diferenciados que é o meristema apical da parte aérea (palmito) que representa a fonte pós-embriônica de todos os órgãos aéreos da cana-de-açúcar e que reúne tanto uma alta dependência de açúcares como também são providos dos mais avançados recursos genéticos de proteção das plantas (TAX & DURBAK, 2006).

Sendo assim, este estudo analisou o perfil de expressão de genes de diferentes vias metabólicas nas folhas jovens que formam o cartucho ("leaf-roof"), por meio da técnica de macroarranjos de cDNA. Essa parte do vegetal foi escolhida por se tratar de um tecido meristemático metabolicamente muito ativo, cujas células encontram-se em fase de intensa divisão celular. Logo, trata-se de uma região tecidual de alto consumo de biomoléculas energéticas (açúcares) provenientes da fotossíntese, fato que permite supor tratar-se de uma região com elevada expressão de genes relacionados à bioenergética.

Portanto o objetivo do presente trabalho foi analisar a expressão de genes da via do metabolismo de açúcar e amido em plantas de cana-de-açúcar submetidas a um período de estresse hídrico.

Material e métodos

Levantamento das principais enzimas de interesse pertencentes às vias metabólicas de plantas.

As principais enzimas pertencentes às vias metabólicas de plantas, tais como as vias do metabolismo do açúcar e amido, metabolismo respiratório e fotossintético, entre outras, foram pesquisadas em diferentes livros de bioquímica (NELSON & COX, 2002), fisiologia de plantas (TAIZ & ZEIGER, 2002) e biologia molecular de plantas (BUCHANAN et al., 2000), em sítios especializados na internet (MetaCyc). Após seleção dessas enzimas, procurou-se na página do projeto SUCEST ESTs relacionadas às mesmas. As ESTs mais representativas de cada enzima, ou seja, aquelas que apresentavam sequências contendo o maior número de bases

correspondentes ao começo do gene foram selecionadas para compor o macroarranjo. Os clones escolhidos tiveram as seqüências de nucleotídeos das ESTs comparadas, por meio do algoritmo BLAST-X, com as seqüências depositadas no banco de dados internacional GENBANK (NCB). Uma seqüência foi considerada como representativa de um gene quando o valor do e-value foi menor ou igual a 1×10^{-10} .

Material vegetal, condições de estresse e coleta dos tecidos

Os toletes da cultivar de cana-de-açúcar SP80-3280 (considerada mediana ao estresse hídrico) cresceram em vasos de plástico com capacidade de 3,5 L. Os vasos, com massa média de 185 g foram preenchidos com Latossolo Vermelho Escuro, textura média até que o conjunto vaso + tolete + solo atingisse massa de 3.800 g. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação por 48 dias, sendo irrigados diariamente, a fim de manter 70 % dos poros do solo preenchido com água (NODA, 2003).

Após 48 dias de brotação e crescimento as plantas foram submetidas ao estresse hídrico no 49^o dia, considerado o dia 1 sem reposição de água e coletou-se o palmito de três plantas testemunhas. A partir de então, a cada quatro dias, foram feitas coletas de amostras dos palmitos de três plantas submetidas aos estresses hídricos de 5, 9, 13 e 17 dias e aferições da massa dos conjuntos vaso + solo para quantificação da água nos vasos. Ao 17^o dia sem reposição de água, todas as plantas restantes submetidas ao estresse hídrico apresentavam morte aparente. Em cada dia de amostragem as amostras de palmito foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para serem posteriormente armazenadas a -80°C .

Extração de RNA total

O RNA total foi isolado de cada uma das amostras (1, 5, 9, 13 e 17 dias de estresse hídrico). Os tecidos (0,3 g) foram macerados em N_2 líquido, transferidos para um tubo, homogeneizadas em 2,0 mL do reagente Trizol (Life Technologies) e mantidas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 0,6 mL de clorofórmio para cada 1 mL do reagente Trizol e as amostras foram agitadas vigorosamente e mantidas por 5 min a temperatura ambiente. Após centrifugação a $12.000 \times g$ por 15 min e a 4°C , o sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo de 15 mL. Adicionou-se ao sobrenadante 0,4 mL de álcool isopropílico para cada 1 mL de reagente Trizol usado na homogeneização inicial. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 10 min e depois centrifugada a $12.000 \times g$ por 15 min, a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol a 75 %. As amostras foram agitadas vigorosamente e centrifugadas a $8.000 \times g$ por 5 min. Logo após, foi feita a secagem do RNA precipitado em bomba de vácuo por 10 min. O precipitado de RNA foi dissolvido em

100 μL de água livre de RNase (tratada com DEPC, 0.1% v/v) e armazenado à -80°C .

O RNA total extraído foi quantificado em espectrofotômetro, na diluição de 1:10 v/v. As medidas de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, cuja relação entre as leituras fornece uma estimativa de pureza do ácido nucléico (SAMBROOK et al., 1989). Utilizou-se água-DEPC para o ajuste inicial do aparelho (Biophotometer/8,5 mm/Eppendorf).

Hibridações Síntese da sonda de cDNA

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

Em um tubo de microcentrífuga estéril foram adicionados 30 μg de RNA total e 156 pmoles de Oligo dT18VN (Invitrogen), resultando em um volume final de 7,5 μL . A mistura foi mantida a 75°C durante 10 minutos e, em seguida, transferida para o gelo. Foram adicionados à reação: 5,0 μL de tampão de síntese de primeira fita (5x, Invitrogen); 2,5 μL de DTT (100mM); 2,0 μL de RNAGuard; 2,5 μL de dNTPs (dATP, dGTP e dTTP a 10mM cada) e 3 μL de ^{33}P - αdCTP (30 μCi). A reação foi incubada durante 5 minutos a 42°C sendo, em seguida, adicionado 1,25 μL da enzima Superscript II (Invitrogen, 200U/ μL). Após rápida centrifugação, a amostra foi mantida por 30 min a 42°C . Após esse período, foi adicionado 1,25 μL de dCTP sem marcação radioativa (10mM) e a reação novamente incubada a 42°C durante 2 horas. Em seguida, adicionou-se 1,0 μL de Poly-A (2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e a reação foi desnaturada a 94°C por 5 minutos. Após a desnaturação, foram adicionados 1,4 μL de NaOH 5 M e a reação mantida a 37°C durante 15 min. A seguir foram adicionados 1,8 μL de HCl 3,94 M e 7,0 μL de Tris-HCl 1,0 M pH 7,5. Para a purificação da sonda, o volume da reação foi ajustado para 50 μL com água deionizada e estéril. A sonda foi purificada, para a retirada de nucleotídeos livres, através de uma coluna Sephadex G-50 equilibrada com STE, a qual foi montada em uma seringa de 1,0 mL contendo lâ de vidro silicizada em sua extremidade inferior (SAMBROOK et al., 1989). Através de centrifugação a 4.000 rpm (centrífuga clínica) durante 4 min, o volume eluído da coluna foi recuperado em um novo tubo estéril. Em seguida, 100 μL de STE foram adicionados à coluna e, após nova centrifugação a 4000 rpm durante 4 min, o volume eluído foi coletado e adicionado ao obtido anteriormente. A incorporação radioativa nas fitas de cDNA (sonda) foi avaliada por meio de um cintilador líquido (Beckman LS6500, USA) e, após esta leitura, a sonda foi desnaturada a 95°C durante 5 min e, em seguida, mantida no gelo até o momento de ser adicionada à solução de hibridação nos frascos contendo as membranas.

Pré-hibridação e Hibridação das Membranas de Alta Densidade

As membranas foram colocadas, inicialmente, em solução SDS 0,1% fervente para redução do “background”, conforme as recomendações do fabricante. As membranas foram colocadas em frascos cilíndricos (15 x 3,5 cm) contendo a solução de pré-hibridação e incubadas em forno de hibridação Hybaid (Halbrook, NY) a 58 °C, com rotação dos frascos por 4 horas, durante a primeira utilização das membranas. Utilizou-se um volume de 10 mL de solução de pré-hibridação por membrana. A solução de pré-hibridação foi mantida nos frascos durante o período de hibridação visto que a solução de hibridação apresenta a mesma composição que a anterior. As sondas purificadas foram adicionadas aos frascos contendo as membranas e a solução de pré-hibridação, e, então, submetidas à hibridação durante 18 h a 58 °C. Após este período, a solução de hibridação foi descartada e as membranas lavadas.

Lavagem das membranas

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

Remoção da sonda

Para a remoção da sonda as membranas foram lavadas duas vezes, por períodos de 15 min a 65 °C, com 100 mL de solução (pré-aquecida a 65 °C) por membrana contendo NaOH 0,4 N + SDS 0,1% e lavadas 2 vezes à temperatura ambiente com uma solução de SDS 0,1 % + SSC 0,1 % + Tris-HCl 0,2 N pH 8,0. As membranas foram novamente seladas e colocadas nos cassetes por períodos de 96 h. A eficiência da remoção da sonda foi monitorada repetindo-se o processo de leitura do sinal obtido pelo fósforo radioativo (FLA-3000-Fujifilm).

Preparação de membranas para macroarranjo

Para realização do ensaio foi utilizado um conjunto de cinco membranas de alta densidade confeccionadas a partir do DNA plasmidial de clones das ESTs selecionadas, oriundo de diferentes bibliotecas de cDNA do projeto SUCEST. Uma membrana foi utilizada para cada tratamento realizado em triplicata, respectivamente. As amostras de DNA plasmidial contendo as ESTs de cana-de-açúcar foram obtidas por meio de micro-preparação realizada através de lise alcalina em placas de 96

poços, descrita por SAMBROOK et al. (1989) com modificações. Foram transferidas 1202 amostras de DNA plasmidial para membrana de náilon de 85 x 125 mm, carregada positivamente (Genetix), com o auxílio de um sistema automatizado (Q-BOT-GENETIX-UK) do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) antigo Centro Brasileiro de Estocagem de Clones localizado na FCAV/UNESP. As amostras foram depositadas em duplicata com espaçamento de 900 µm entre pontos, num arranjo 3x3, perfazendo um total de 2404 pontos por membrana. Para o monitoramento de hibridações não-específicas, o ponto central de cada arranjo recebeu apenas DMSO, representando, assim, o controle negativo. Após a transferência do DNA, as membranas foram submetidas a tratamento em solução de denaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) e de neutralização (NaCl 1,5 M e Tris Base 1 M pH 7) por 5 e 10 min, respectivamente e, logo em seguida, o DNA foi imobilizado na membrana por meio de radiação com luz UV (1600 J/cm²), seguindo as recomendações do fabricante (Genetix,UK).

Análise estatística dos dados

As imagens geradas foram analisadas, usando-se o programa ArrayVision 8.0 (Image Research / GE), o qual transforma a intensidade luminosa emitida por um ponto da membrana em valor numérico. Previamente, foi informado ao programa um mapa indicando os locais da membrana onde existia sonda e onde não existia. Do mesmo modo, também fora informado o nome da sonda correspondente a um dado ponto da membrana. Logo, para cada imagem obtida de uma dada membrana, o programa gerou uma tabela contendo um número de linhas igual ao número de pontos/ESTs presentes na membrana, incluindo os pontos que só apresentam DMSO em sua composição (controle negativo). Essa tabela contém pelo menos três colunas: a primeira contém a identificação do ponto, LR, por exemplo, uma possui os valores referentes à emissão de fundo (“background”) e uma outra possui os valores referentes ao sinal emitido pelo interior do ponto/EST (“foreground”). Uma vez que foi realizada três repetições para cada ponto de análise (1, 5, 9, 13 e 17 dias) ao final foram obtidas 15 imagens, que, após análise com o ArrayVision, geraram 15 tabelas distintas.

As tabelas geradas pelo programa ArrayVision 8.0, em formato texto delimitado por tabulações, foi lida no programa estatístico R em ambiente GNU Linux Debian 3.2. No ambiente estatístico R, a qualidade dos arranjos foi avaliada por meio da visualização gráfica, as intensidades foram normalizadas e as subsequentes análises estatísticas realizadas. O programa R foi utilizado para averiguar a qualidade, realizar as normalizações e identificar os genes diferencialmente expressos. Antes do processo de normalização, os valores referentes à emissão de fundo foram subtraídos do respectivo valor colhido para o ponto onde se localizava a sonda, gerando o valor líquido para o res-

pectivo ponto. Em seguida, geraram-se gráficos do tipo, “box plot” para verificar a necessidade de se realizar uma normalização. Se verificada essa necessidade, esta foi feita globalmente, aplicando o método VSN (HUBER et al., 2002), e sua eficácia foi averiguada produzindo e observando o mesmo tipo de gráfico observado antes da normalização. Após a normalização, realizaram-se os procedimentos estatísticos e os genes diferencialmente expressos em cada situação de interesse foram identificados, com uma significância de 5% ($p \leq 0,05$). A fim de controlar a seleção de falsos positivos, utilizou-se um valor de FDR (186) igual a 0,05 para selecionar os genes significativos, ou seja, dentre todos os genes selecionados, a taxa de falsos positivos estará, estatisticamente, sempre abaixo de 5%.

Análise por ferramentas de bioinformática

As seqüências foram analisadas no Setor de Bioinformática do Laboratório de Bioquímica e Biologia Moleculares da FCAV/UNESP e submetidas aos bancos de dados de nucleotídeos para identificação da seqüência de EST utilizada. A análise buscou a identificação e localização das proteínas por eles codificadas nas vias metabólicas já citadas. Para isso, utilizaram-se inicialmente, ferramentas de identificação como Proteome Analyst 2.0, e, em seguida, bancos de dados públicos de motivos e domínios de proteínas (Prosite, Pfam, ProDom, Interpro, entre outros). Após a busca nos bancos de dados públicos, os clones foram agrupados nas categorias propostas pelo SUCEST, denominadas: metabolismo de aminoácido; bioenergético; comunicação celular/tradução de sinal; dinâ-

mica celular; metabolismo de DNA; metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isoprenóides, elementos genéticos móveis; metabolismo de nitrogênio, enxofre e fosfato; metabolismo de nucleotídeos; crescimento e desenvolvimento de plantas; metabolismo de proteínas; metabolismo e transcrição de RNA; metabolismo secundário; proteínas de estocagem; resposta a estresse; transporte; proteína putativa e não classificada. O agrupamento se deu com base na função biológica exercida pela proteína (DEDEMO, 2006).

Resultados e discussão

A técnica de macroarranjos de cDNA foi empregada com o objetivo de identificar o padrão de expressão gênica no meristema apical da variedade de cana-de-açúcar SP80-3280 submetida a estresse hídrico. Amostras foram coletadas aos 5, 9, 13 e 17 dias após o início da condição de supressão de água. O dia 1 foi considerado controle, por apresentar 66,2 % dos poros preenchidos com água, o que reflete condições normais de hidratação (NODA, 2003).

A expressão gênica diferencial pôde ser aferida pela diferença observada na intensidade de sinais obtidos para uma determinada EST, após hibridação com cDNAs do palmito em condição controle (dia 1) ou estressada (dias 5, 9, 13 e 17 dias após supressão de água). A intensidade destes sinais reflete, em última instância, as quantidades de RNAs mensageiros produzidos nas plantas controle ou estressadas (Figura 1).

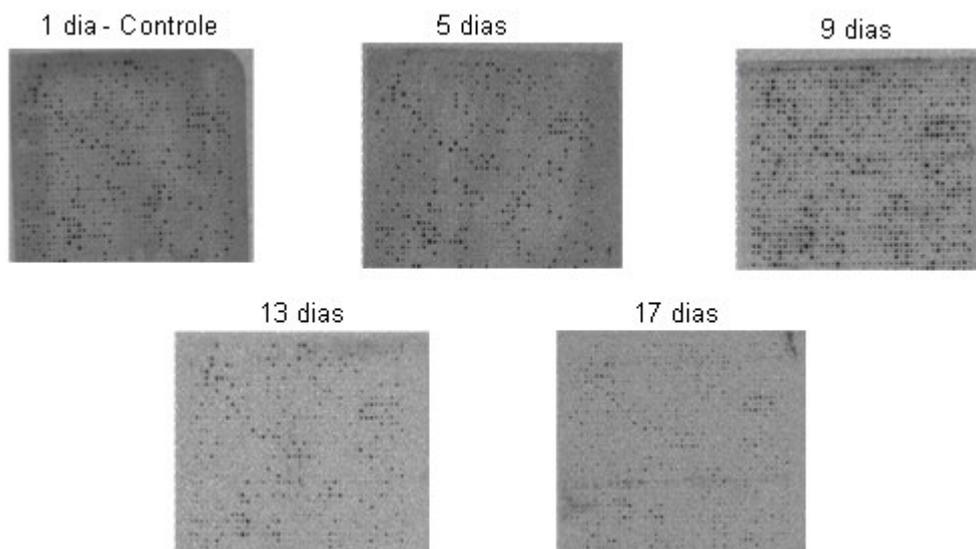


Figura 1 - Imagens digitalizadas das membranas de macroarranjos (85 x 125cm) contendo 1.202 clones em duplicata, hibridadas a partir de 30 µg de RNA total de palmitos de cana-de-açúcar da cultivar SP80-3280 em diferentes intervalos de supressão de irrigação, marcados com 33p- adCTP. *Digitalized images of macroarray membranes (85x125cm), containing 1,202 clones in duplicate, hybridized from 30 µg of sugarcane heart total RNA, in different water suppression intervals, labeled with 33p- adCTP.*

Pode-se observar que a imagem das membranas hibridadas com sondas produzidas a partir de amostras de palmito do controle apresentou um

perfil de expressão diferente quando comparado aos demais dias, sendo possível observar que

houve um menor número de pontos hibridados no dia 17 e o maior número no dia 9 (Figura 1).

Após a realização da análise estatística, as seqüências utilizadas neste trabalho foram submetidas aos bancos do NCBI para identificação da proteína codificada (BLASTx), as quais foram agrupadas de acordo com a categorização proposta por TELLES et al. (2001) como mostrado na Figura 2.

As ESTs foram selecionadas com B estatístico > 0 e $p < 0,05$ (5%) (Tabela 1).

Os dados da Figura 2 indicam que as quatro categorias com a maior porcentagem de ESTs colocadas na membrana, em ordem decrescente, foram: [SC.2] Bioenergética, [SC.13] Metabolismo secundário, [SC.1] Metabolismo de aminoácido e para quarta categoria houve uma mudança a partir do dia 5 de estresse hídrico, alterando de [SC.11] Metabolismo de Proteína para [SC.15] Resposta ao Estresse, embora essa diferença no dia 5 seja muito pequena (5,33% e 6,00%, respectivamente). Tal comportamento se justifica em função da parte da planta estudada, que é o palmito, onde se concentra uma alta atividade metabólica de células, constituindo os tecidos meristemáticos cujas células encontra-se em fase de intensa divisão celular exibindo uma expressiva dependência de biomoléculas energéticas (açúcares) provenientes da fotossíntese, justificando a alta expressão gênica na categoria de Bioenergética.

As análises da expressão gênica do meristema apical da parte aérea, a partir de onde são produzidas todos os órgãos pós embrionários das plantas, revela também uma intensa atividade de genes pertencentes à categoria do Metabolismo Secundário, especialmente aqueles envolvidos na biossíntese das moléculas típicas, destinadas a atender à demanda das células que se diferenciam formando cada uma das células que irão compor os tecidos e órgãos da parte aérea da cana-de-açúcar.

Neste mesmo contexto, destacam-se também os mecanismos de distribuição de carbono orgânico e energia para o desempenho metabólico da síntese e degradação (categoria do Metabolismo de Aminoácidos), que irão compor as proteínas fisiológicas, estruturais e metabólicas das novas células e tecidos da parte aérea das plantas. No dia 9 e subsequentes dias de estresse, a quarta categoria mais expressa foi a [SC.15] Resposta ao estresse, sugerindo que a planta iniciou mecanismos de defesa contra o estresse hídrico.

Tendo em vista que a categoria de bioenergética prevaleceu com a maior porcentagem em todos os dias de estresse hídrico e na planta controle e que a parte da planta estudada (palmito) refere-se a uma região composta essencialmente de células meristemáticas, estritamente dependentes dos produtos da fotossíntese (açúcares), no presente trabalho estaremos enfatizando as proteínas relacionadas à função de bioenergética (Tabela 1).

A reação catalisada pela invertase é irreversível na reação da degradação da sacarose (Figura 3).

Existem duas formas de invertase, uma com um pH ácido ótimo, e a outra que inicia muitas atividades sobre condições alcalinas. Estas formas têm funções em diferentes compartimentos celulares: invertase alcalina no citosol e a invertase ácida no vacúolo e na parede celular. Esta é a principal enzima relacionada com a entrada da molécula de sacarose no citoplasma. A sacarose é estocada no vacúolo e provavelmente hidrolisada neste compartimento, resultando em hexoses livres e subsequentemente transportadas para o citosol. A EST SCCRT1C06D06 (Tabela 1), que codifica a enzima Invertase (INV) mostrou-se induzida, comparado com o controle, a partir do dia 9, os dados sugerem que neste período houve aumento na degradação da sacarose.

A Sacarose Fosfato Sintase (SFS) é a principal enzima que controla a biossíntese de açúcar em plantas superiores e cataliza a reação de formação de Sacarose-6-fosfato a partir da Frutose-6-fosfato e UDP-glicose (HUBER & HUBER, 1996) (Figura 4).

A EST (SCUTRZ3103C01, Tabela 1) que codifica a enzima SFS mostrou-se induzida, comparado ao controle, nos dias 9 e 17 e a EST (SCCST2001G08, Tabela 1) Sacarose Fosfato Fosfatase (SFF), foi induzida em todos os dias, indicando que a via de síntese de sacarose provavelmente está ativa.

Nossos resultados estão de acordo com o trabalho de INDRA DEWI & SUGIHARTO (2001) que verificaram que o estresse hídrico pode induzir a atividade da SFS e conseqüentemente, o acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar, em plantas não irrigadas. Os autores também observaram que o conteúdo de sacarose aumentou quase três vezes durante os nove dias sem água. Para SUGIHARTO (2004), estes resultados mostraram que o déficit de água aumentou a expressão das enzimas que assimilam carbono, especialmente a SFS, para aumentar o conteúdo de sacarose, que atua como um osmoprotetor e mantém um gradiente potencial favorável de água através da célula da membrana.

Com o acúmulo de sacarose no meristema apical, a planta sinaliza que está sofrendo algum tipo de estresse, com isso, induz a síntese de trealose. A via de biossíntese da trealose ocorre em duas reações, sendo a primeira catalisada pela enzima Trealose Fosfato Sintase e envolve a transferência de glicose a partir de UDP-glicose a glicose-6-fosfato, obtendo desta forma a trealose-6-fosfato (T6P) e uridina difosfato (UDP). Na segunda reação, a enzima trealose fosfato fosfatase então converte a trealose-6-fosfato em trealose livre (CHEN & HADDAD, 2004; SCHLUEPMANN et al., 2004; KOSMAS et al., 2006) (Figura 5).

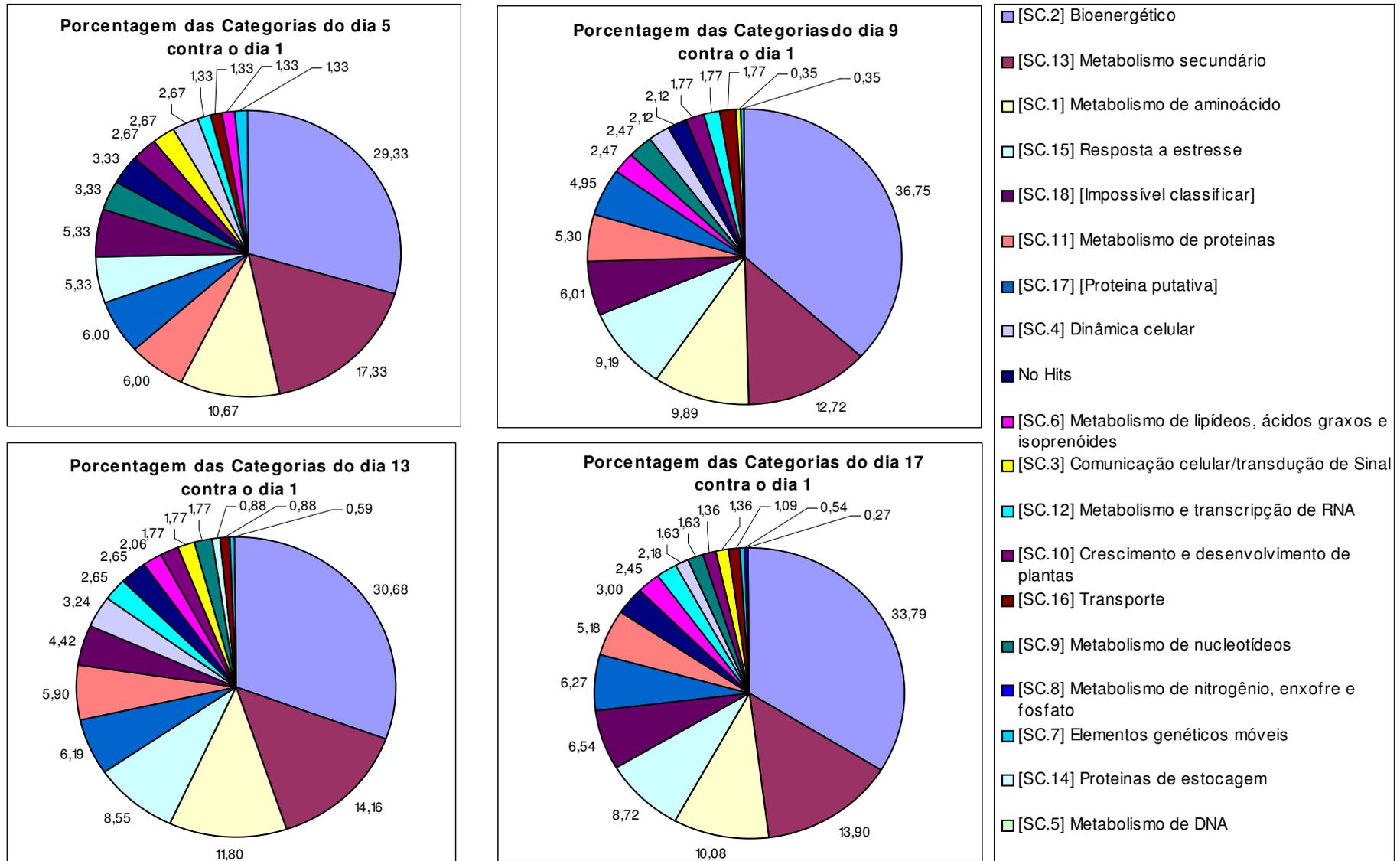


Figura 2 - Porcentagem das categorias expressa durante os dias de estresse hídrico. *Percentage of expressed categories during the water stress days.*

Tabela 1 - Médias e sequencias similares das ESTs pertencentes a categoria de bioenergética em cana-de-açúcar submetidas ao estresse hídrico. *Means and similar sequences of ESTs belonging to bioenergetic category in sugarcane submitted to water stress.*

| Identidade do clone | Nº de acesso ^a | E value | Descrição ^b | Dias de estresse hídrico x controle ^c | | | |
|---------------------|---------------------------|----------|---|--|---------|---------|---------|
| | | | | 5 x 1 | 9 x 1 | 13 x 1 | 17 x 1 |
| SCMCLV1030C12 | CA299800 | 4,00E-60 | fructose-bisphosphate aldolase class-I [Oryza sativa] (EC 4.1.2.13) | | -2,3505 | -3,0873 | -2,9795 |
| SCCART1C06D06 | CA190800 | 4,00E-41 | cell wall invertase [Saccharum hybrid cultivar] (EC 3.2.1.26) | | 1,8222 | 2,0497 | 3,1186 |
| SCJFLR1013B06 | CA121722 | 1,00E-37 | fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase | | | 1,2399 | 1,7173 |
| SCCCST2001G08 | CA179927 | 1,00E-41 | sucrose phosphate phosphatase [Saccharum officinarum] (EC 3.1.3.24) | 1,267 | | 1,5603 | 1,6066 |
| SCEZSB1091A09 | CA195219 | 4,00E-59 | glucose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.9) 1 - maize | | | 1,4238 | 1,7502 |
| SCUTRZ3103C01 | CA166100 | 1,00E-23 | sucrose-Phosphate Synthase [Saccharum officinarum] (EC 2.4.1.14) | | 3,1149 | | 3,3688 |
| SCCART2C09A10 | CA191537 | 1,00E-34 | glucose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.9) | | -1,6882 | | -1,3332 |
| SCBFRT1064F09 | CA130813 | 7,42E-09 | putative trehalose-6-phosphate synthase [Oryza sativa] | 5,761 | 5,5883 | 6,3453 | 5,9757 |
| SCJLRT1017B04 | CA135231 | 7,00E-56 | hexokinase 7 [Oryza sativa] (EC 2.7.1.1) | | | -5,439 | -3,4823 |
| SCJLLR1011A09 | CA122348 | 1,00E-69 | putative trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase [Oryza sativa] | 1,4156 | 2,0057 | 2,1642 | 2,2903 |
| SCQGAM2110H12 | CA087299 | 2,00E-51 | putative diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase | | 96128 | . | -2,488 |
| SCSGRT2066A07 | CA145679 | 1,00E-75 | putative pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit | | -1,9202 | -1,8232 | -2,1129 |

^aO número de acesso de cada sequencia foi obtido usando algoritmo BLASTX;

^bDescrição das proteínas (novo BLASTX para confirmação da descrição realizado dia 13.05.07 no NCBI).

^cCada valor representa a média entre a intensidade de cada intervalo de estresse e do controle de três experimentos independentes

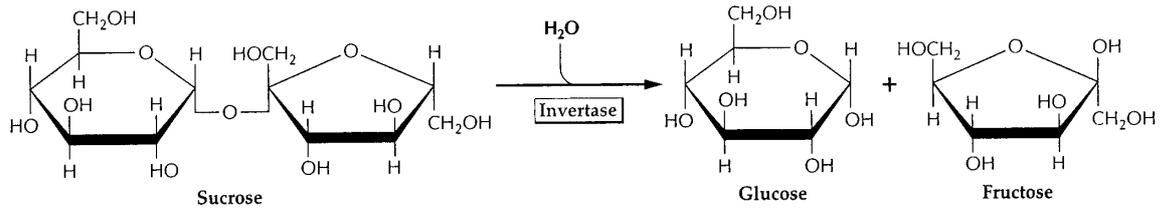


Figura 3 – Degradação da sacarose pela invertase. (Fonte: BUCHANAN et al., 2000). *Sucrose degradation by invertase (Source: BUCHANAN et al., 2000).*

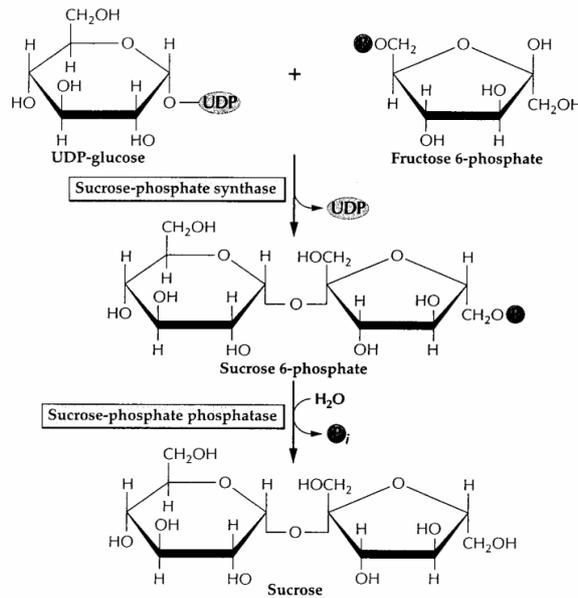


Figura 4 - Síntese da sacarose pela Sacarose Fosfato Sintase e Sacarose Fosfato Fosfatase (Fonte: BUCHANAN et al., 2000). *Sucrose synthesis by Sucrose Phosphate Synthase and Phosphate Phosphatase (Source: BUCHANAN et al., 2000).*

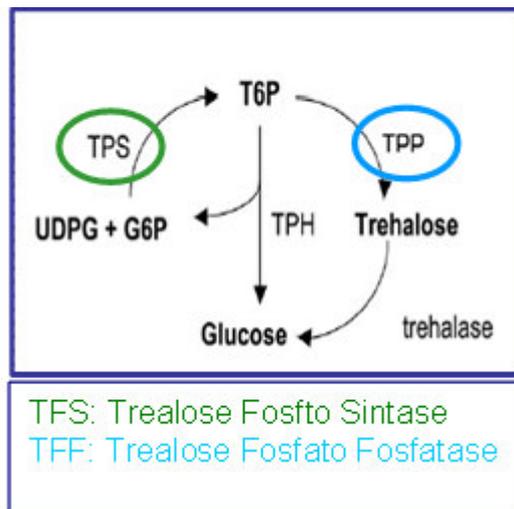


Figura 5 - Biossíntese da trealose pela enzima Trealose Fosfato Fosfatase, *Trehalose biossintesis by Trehalose Phosphate Phosphatase.*

As ESTs (SCBFRT1064F09 e SCJLLR1011A09 Tabela 1), que codificam as enzimas Trealose Fosfato Sintase (TFS) e Trealose Fosfato Fosfatase (TFF), respectivamente mostraram-se induzidas em todos os dias de estresse hídrico. DEDEMO (2006), que utilizou a técnica de macroarranjo com cDNA de folhas de cana-de-açúcar, observou a indução da enzima TFS na cultivar tolerante (SP80-2847) e na sensível (SP90-1638) de cana-de-açúcar submetidas ao estresse hídrico. Já a enzima TFF foi reprimida na cultivar tolerante e induzida na cultivar sensível. NODA (2003) que também utilizou a técnica de macroarranjo com cDNA em palmitos de cana-de-açúcar submetidas a es-

trese hídrico, observou que o nível de expressão relativa da TFS foi 6,5 vezes maior em bibliotecas de palmitos estressadas, quando comparadas com as bibliotecas do projeto SUCEST não estressadas.

Considerando que a trealose esteja presente e que possa estar inibindo a fosforilação da molécula de glicose pela enzima Hexoquinase (HXQ), como observado por BLÁZQUEZ et al., (1993) em leveduras, encontrou-se em cana-de-açúcar uma EST (SCJLRT1017B04, Tabela 1) também reprimida, que codifica esta enzima. Estes resultados sugerem a regulação da via da glicólise visto que esta enzima atua na etapa inicial do processo respiratório (Figura 6).

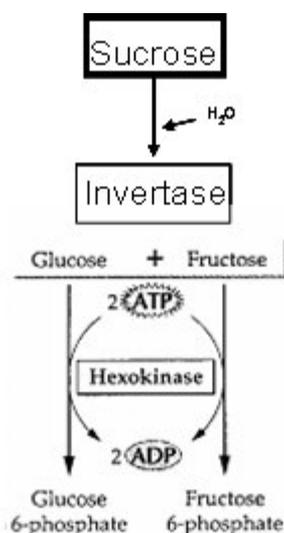


Figura 6 - Uso de ATP pela Hexoquinase para fosforilar glicose e frutose, produtos da invertase (Adaptada de BUCHANAN, 2000). *ATP requirement for Hexokinase to phosphorylate glucose and fructose, invertase products (Adapted from BUCHANAN, 2000).*

Tal situação condiz com o estado de estresse hídrico em que a planta se encontra, restringindo o rendimento fotossintético (MUNNEBOSCH et al., 2001, KRIEGER-LISZKAY, 2004) e sinalizando os tecidos meristemáticos sobre uma redução na atividade de crescimento (GIBSON, 2005).

Conclusões

Com base em nossos resultados, podemos concluir que:

I. Os macroarranjos de DNA de nylon podem ser utilizados eficientemente e com boa reprodutividade para a análise do perfil de expressão de vários genes, simultaneamente.

II. As normalizações testadas permitiram a redução da variabilidade nos dados gerados nos macroarranjos, aumentando assim a confiabilidade da técnica.

III. As ESTs (SFS e SFF) induzidas indicam que a via de síntese da sacarose está ativa,

provavelmente na regulação do potencial osmótico celular;

IV. A indução das ESTs (TFS e TFF) é um indicativo do estresse hídrico, onde a síntese de trealose possa atuar como inibidor da via glicolítica, reduzindo o consumo de açúcares, fato este confirmado pela inibição da EST que codifica a enzima HKQ que é a principal enzima da via glicolítica e,

V. Todo esse panorama está de acordo com o estado de estresse hídrico em que a cana-de-açúcar se encontra (com um baixo rendimento fotossintético e redução na atividade de crescimento dos tecidos meristemáticos).

Referências

BLÁZQUEZ, M. A.; LAGUNAS, R.; GANCEDO, C.; GANCEDO, J. M. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. **Federation of European**

- Biochemical Societies**, v.329, nº 1-2, p.51-54, 1993.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000, p.638-673.
- CHEN, Q.; HADDAD, G. G. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. **The Journal of Experimental Biology**, v.207, n.18, p.3125-3129, 2004.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira. Cana-de-açúcar, Safra 2011/2012, Primeiro Levantamento Maio/2011**. 2011. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_27_11_53_13_boletim_cana_portugues_-_maio_2011_1o_lev..pdf Acesso em: 01 de jul. 2011.
- DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: Heinz, D. J. **Sugarcane improvement through breeding**, Amsterdam: Elsevier, 1987. p.7-84.
- DEDEMO, G. **Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em duas cultivares de cana-de-açúcar**. 2006. 75f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- FLEXAS, J.; GALME'S, J.; RIBAS-CARBO, M.; MEDRANO, H. The effects of drought in plant respiration. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. **Plant Respiration: from Cell to Ecosystem**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2005, p.85–94.
- FLEXAS, J.; BOTA, J.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBO, M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Physiologia Plantarum**, v.127, p.343–352, 2006.
- FRANCIS, D.; HALFORD, N. G. Nutrient sensing in plant meristems. **Plant Molecular Biology**, v.60, n.6, p.981–993, 2006.
- GIBSON, S. I. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Plant Biology**, v.8, n.8, p.93–102, 2005.
- HUBER, S. C.; HUBER, J. L. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. **Plant Molecular Biology**, v.4, p.431–441, 1996.
- HUBER, W.; von HEYDEBRECK, A.; SÜLTMANN, H.; POUSTKA, A.; VINGRON, M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to quantification of differential expression. **Bioinformatics**, v.18, n.1, p.96-104, 2002.
- INDRA DEWI, R. S.; SUGIHARTO, B. Effect of drought stress on carbohydrate metabolism and nitrogen assimilation in sugarcane plant. In: **2nd Indonesian Biotechnology Conference**, Yogyakarta, 2001, p.23.
- INGELBRECHT, I. L.; IRVINE, J. E.; MIRKOV, T. E. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection Of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiology**, v.119, n.4, p.1187-98, 1999.
- KOSMAS, S. A.; ARGYROKASTRITIS, A.; LOUKAS, M. G.; ELIOPOULOS, E.; TSAKAS, S.; KALTSIKES, P. J. Isolation and characterization of drought related trehalose 6-phosphate-synthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Planta**, v.223, n.2, p.329-339, 2006.
- KRIEGER-LISZKAY, A. Singlet oxygen production in photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.411, p.337–346, 2004.
- LAWLOR, D. W. Limitation of photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, v.89, n.7, p.871-885, 2002.
- LIU, X; BAIRD, W. V. Differential Expression of Genes Regulated in Response to Drought or Salinity Stress in Sunflower. **Crop Science**, v.43, n.2, p.678–687, 2003.
- MENOSSI, M; SILVA-FILHO, M. C.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M. A.; SOUZA, G. M.; Sugarcane Functional Genomics: Gene Discovery for agronomic Trait Development. **International Journal of Plant Genomics**. Review Article, 11 p. 2008.
- MUNNÉ-BOSCH, S.; JUBANY-MARÍ, T.; ALEGRE, L. Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. **Plant, Cell & Environment**, v.24, n.12, p.1319-1327, 2001.

- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3.ed. São Paulo: SARVIER, 2002, 975p.
- NODA, R. W. **Etiquetas de seqüências expresas (ESTs) relacionadas ao estresse hídrico na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar**. 2003. 76f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- PIEN S.; WYRZYKOWSKA, J.; FLEMING, A. J. Novel marker genes for early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate metabolism within the apical meristem. **The Plant Journal**, v.25, n.6, p.663-674, 2001.
- PRICE, J.; LAXMI, A.; MARTIN, S. K. S. T.; JANGA, J. C. Global Transcription Profiling Reveals Multiple Sugar Signal Transduction Mechanisms in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 16, n.8, p.2128–2150, 2004.
- QUIANG, L.; NANMING, Z.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. **Chinese Science Bulletin**, v.45, n.11, p.970-975, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SCHLUEPMANN, H.; VAN DIJKEN, A.; AGHDASI, M.; WOBBS, B.; PAUL, M.; SMEEKENS, S. Trehalose Mediated Growth Inhibition of Arabidopsis Seedlings Is Due to Trehalose-6-Phosphate Accumulation. **Plant Physiology**, v.135, n.2, p.879–890, 2004.
- SCHUMMER, M.; WAILAP, V. N. G.; BUMGARNER, R. E.; NELSON, P. S.; SCHUMMER, B.; BEDNARSKI, D. W.; HASSELL, L.; BALDWIN, R. L.; KARLAN, B. Y.; HOOD, L. Comparative hybridization of an array of 21500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. **Gene**, Napoli, v. 238, n.2, p. 375-385, 1999.
- SUGIHARTO, B. Biochemical And Molecular Studies On Sucrose-Phosphate Synthase And Drought Inducible-Protein In Sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Jurnal ILMU DASAR**. v. 5, n.1, p.62-67, 2004.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology**, 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002, p.690.
- TAX, F. E.; DURBAK, A. Meristems in the movies: live imaging as a tool for decoding intercellular signaling in shoot apical meristems. **The Plant Cell**, v.18, n.6, p.1331–1337, 2006.
- TELLES, G. P.; BRAGA, M. D. V.; DIAS, Z.; LIN, T.-L.; QUITZAU, J. A. A.; DA SILVA, F. R.; MEIDANIS, J. Bioinformatics of the Sugarcane EST Project. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, n. 1-4, p.9-15, 2001.
- UNICA. União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. **Moagem de cana da safra 11/12 no CS está 23% menor**. 2011. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/clipping/show.asp?cppCode=49D93B9E-380B-46A1-A5E4-4DD3B11BAB9A>> Acesso em: 01 julho 2011.
- WARREN, C. R.; DREYER, E. Temperature response of photosynthesis and internal conductance to CO₂: results from two independent approaches. *Journal of Experimental Botany*. v.57, n.12, p.3.057-3.067, 2.006.