

**ESTUDO DAS VIAS DE DESCARBOXILAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE C4 EM  
CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO**

**VIVIANE CACEFO**

**ESTUDO DAS VIAS DE DESCARBOXILAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE C4 EM  
CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO**

**VIVIANE CACEFO**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador:  
Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira  
Coorientadora:  
Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas

633.61  
C118e

Cacefo, Viviane.

Estudo das vias de descarboxilação da fotossíntese C4 em cana-de-açúcar submetida ao déficit hídrico / Viviane Cacefo. – Presidente Prudente, 2017.

82 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2017.

Bibliografia.

Orientador: Luiz Gonzaga Esteves Vieira

1. *Saccharum* spp. 2. Estresse Abiótico. 3. Regulação Gênica. 4. Atividade enzimática. I. Título.

**Campus I** Rua José Bongiovani, 700 · Cidade Universitária · CEP 19050 920 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 1000  
**Campus II** Rodovia Raposo Tavares, Km 572 · Bairro Limoeiro · CEP 19067 175 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 2000

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ESTUDO DAS VIAS DE DESCARBOXILAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE C4 EM CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO"

AUTOR(A): VIVIANE CACEFO

ORIENTADOR(A): LUIZ GONZAGA ESTEVES VIEIRA

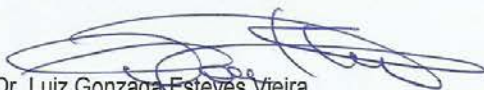
Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:



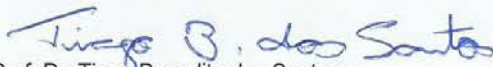
Prof. Dr. Douglas Silva Domingues

UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ Rio Claro (SP)



Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)



Prof. Dr. Tiago Benedito dos Santos

PMPD / CAPES - UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Data da realização: 17 de fevereiro de 2017.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus, a minha família e a todos que estiveram presentes, me apoiando em sua realização.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois tudo se realiza de acordo com vontade Dele, pelo dom da vida e a Nossa Senhora Aparecida pela proteção e intercessão.

A minha família, especialmente aos meus pais Ademir e Leandra, pelo amor, apoio, confiança, paciência, e por estarem sempre presentes durante a minha formação pessoal e profissional, com exemplos de humildade, honestidade e caráter.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira (Santista) por confiar em mim no desenvolvimento deste trabalho, pela orientação e dedicação para que ele fosse realizado da melhor maneira possível, pela amizade e oportunidade de conviver e adquirir um pouco do seu conhecimento.

A Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas que tanto colaborou como coorientadora, agradeço pela dedicação, paciência, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Douglas Silva Domingues pelo apoio.

Ao Rafael Rebes Zilliani e Daniel Moreira Neris pela amizade que construímos, pelo companheirismo e auxílio na execução deste trabalho. A ajuda de vocês foi essencial!

A todos os professores e funcionários da UNOESTE que de alguma forma contribuíram com este trabalho e nesses dois anos de formação profissional.

Ao Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal do Oeste Paulista (CEVOP), a todos os professores, pós-graduandos e graduandos que fazem parte deste centro, por me acolherem e permitirem que eu fizesse parte deste grupo de estudos, pesquisa e trabalho. Obrigada pelas amizades construídas, pela ajuda, alegrias e por todos os momentos compartilhados.

As amizades que construí durante o mestrado e a todos os colegas e amigos que dentro e fora da universidade tornaram essa caminhada mais “leve” e feliz.

Muito obrigada!

*“Não vês que somos viajantes?  
E tu me perguntas: O que é viajar?  
Eu respondo com uma palavra: é avançar!  
Experimentais isto em ti.  
Que nunca te satisfaças com aquilo que és,  
para que sejas um dia aquilo que ainda não és.  
Avança sempre! Não fiques parado no caminho!”  
(Santo Agostinho)*

## RESUMO

### **Estudo das vias de descarboxilação da fotossíntese C4 em cana-de-açúcar submetida ao déficit hídrico**

As plantas C4 são classificadas em três grupos de acordo com as enzimas utilizadas para descarboxilação de ácidos C4 na bainha dos feixes vasculares: subtipos NADP-ME, NAD-ME e PEPCK. Inúmeras evidências moleculares, bioquímicas e fisiológicas indicam que plantas C4 podem exibir certo nível de flexibilidade na utilização dos três mecanismos de descarboxilação, dependendo de fatores ambientais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação das vias de descarboxilação da fotossíntese C4 em cana-de-açúcar (espécie NADP-ME) sob déficit hídrico. O experimento foi realizado com dois genótipos - RB92579 (tolerante ao déficit hídrico) e SP80-3280 (suscetível ao déficit hídrico) submetidos a quatro tratamentos: controle (condições normais de suprimento de água), estresse moderado (-1,5 a -1,8 MPa), estresse severo (abaixo de -2,0 MPa) e recuperação (48 hrs após a reidratação). Foram realizadas análises de potencial de água foliar, trocas gasosas foliares e biomassa para caracterização fisiológica das plantas. As alterações nas respostas transcricionais dos genes codificadores de enzimas do ciclo C4 (*NADP-ME*, *NAD-ME*, *PEPCK*, *AspAT*, *AlaAT*, *PEPC*, *NADP-MDH* e *PPDK*) e atividades das enzimas NADP-ME, NAD-ME, PEPCK, AspAT e AlaAT, foram analisadas por RT-qPCR e espectrofotometria, respectivamente. Em condições de déficit hídrico, o genótipo SP80-3280 foi mais sensível ao estresse por seca em termos de aumento da perda de biomassa e menor potencial de água foliar. Também mostrou menor capacidade de recuperação fotossintética após reidratação do que o genótipo tolerante RB92579. As análises transcricionais e das atividades das enzimas envolvidas na via fotossintética C4 mostraram que a cana-de-açúcar utiliza a via PEPCK como mecanismo de descarboxilação, além da NADP-ME, mais evidente em condições de déficit hídrico tanto para genótipos tolerantes à seca como para suscetíveis. Finalmente, os resultados aqui obtidos, juntamente com a informação existente, não suportam a classificação estabelecida da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) como um subtipo C4 NADP-ME clássico, mas considerá-la como uma espécie NADP-ME + PEPCK.

**Palavras-chave:** *Saccharum* spp. Estresse Abiótico. Regulação Gênica. Atividade Enzimática.



## ABSTRACT

### Study of the decarboxylation pathways of C4 photosynthesis in sugarcane submitted to water deficit

C4 plants have been classified into three groups based on the enzymes used to decarboxylate C4 acids in the bundle sheath: NADP-ME, NAD-ME and PEPCK subtypes. Numerous molecular, biochemical and physiological evidences indicate that C4 plants could exhibit a certain degree of flexibility in the use of the three established decarboxylation mechanisms, depending on environmental factors. In this context, the objective of this work was to evaluate the modulation of the pathways of decarboxylation of the C4 photosynthesis in sugarcane (NADP-ME specie) under water deficit. The experiment was realized with two genotypes - RB92579 (tolerant to water deficit) and SP80-3280 (susceptible to water deficit) submitted to four treatments: control (normal conditions of water supply), moderate stress (-1,5 to -1,8 MPa), severe stress (below -2,0 MPa) and recovery (48 hours after rehydration). Leaf water potential, leaf gas exchange and biomass production were measured for the physiological characterization of the plants. Changes in the transcriptional responses of genes encoding C4-cycle enzymes (*NADP-ME*, *NAD-ME*, *PEPCK*, *AspAT*, *AlaAT*, *PEPC*, *NADP-MDH* and *PPDK*) and the activities of the enzymes NADP-ME, NAD-ME, PEPCK, AspAT and AlaAT were analyzed by RT-qPCR and spectrophotometry, respectively. Under water deficit conditions the genotypes SP80-3280 was more sensitive to drought stress in terms of increased loss of above ground biomass and lower leaf water potential. It also showed less capacity of photosynthetic recovery following rehydration compared to the tolerant genotypes RB92579. The analysis of transcriptionals and of the activities of enzymes involved in the C4 photosynthetic pathway showed that sugarcane uses the PEPCK pathway as a decarboxylation mechanism in addition to the NADP-ME, which was more evident under water deficit conditions for both the drought tolerant and susceptible genotypes. Finally, the results here obtained, together with the existing information, do not support the established classification of sugarcane (*Saccharum* spp.) as a classical NADP-ME C4 subtype, but instead should be considered as a NADP-ME + PEPCK species.

**Keywords:** *Saccharum* spp. Abiotic Stress. Gene Regulation. Enzymatic Activity.

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

A	– Assimilação líquida de CO <sub>2</sub>
AC	– Anidrase carbônica
ADP	– Adenosina difosfato
Af	– Área foliar
Ala	– Alanina
AlaAT	– Alanina aminotransferase
Asp	– Aspartato
AspAT	– Aspartato aminotransferase
ATP	– Adenosina trifosfato
Bicina-KOH	– Bis(2-hidroxietil)glicina hidróxido de potássio
BSA	– Bovine Serum Albumin (Albumina de soro bovino)
C <sup>14</sup>	– Carbono-14
cDNA	– DNA complementar
Chl	– Clorofila
cm	– Centímetros
cm <sup>2</sup>	– Centímetros quadrados
CoA	– Coenzima A
CO <sub>2</sub>	– Dióxido de carbono
C <sub>q</sub>	– Quantification cycle (Ciclo de quantificação)
CTC	– Centro de Tecnologia Canavieira
DAP	– Dias após o plantio dos toletes
DE	– Dias sob estresse
DEPC	– Diethyl pyrocarbonate (Dicarbonato de dietila)
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DNAse	– Desoxirribonuclease
dNTP	– Desoxirribonucleotídeo fosfatado
DTT	– Ditioneitol
E	– Transpiração
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	– Ácido etilenoglicol tetra-acético
ESTs	– Expressed sequence tags (Etiquetas de sequências expressas)
g	– Gramas
g	– Gravidade
GAPDH	– Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Gs	– Condutância estomática
Hepes-KOH	– Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanolssulfônico hidróxido de potássio
hrs	– Horas
kg	– Quilogramas
KHCO <sub>3</sub>	– Bicarbonato de potássio
M	– Molar

m	– Metros
m <sup>2</sup>	– Metros quadrados
Mal	– Malato
mg	– Miligramas
MgCl <sub>2</sub>	– Cloreto de magnésio
min	– Minutos
mL	– Mililitros
mM	– Milimolar
mmol	– Milimol
MnCl <sub>2</sub>	– Cloreto de manganês
MPa	– Megapascal
<i>MFC</i>	– Massa fresca do colmo
<i>MSC</i>	– Massa seca do colmo
<i>MSF</i>	– Massa seca foliar
<i>MSR</i>	– Massa seca da raiz
<i>MST</i>	– Massa seca total
NaCl	– Cloreto de sódio
NAD <sup>+</sup>	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NAD-ME	– Enzima málica dependente de NAD <sup>+</sup>
NADP <sup>+</sup>	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NADP-MDH	– Malato desidrogenase dependente de NADP <sup>+</sup>
NADP-ME	– Enzima málica dependente de NADP <sup>+</sup>
ng	– Nanogramas
nm	– Nanômetros
OAA	– Oxaloacetato
pb	– Pares de base
PCR	– Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PEG	– Polietilenoglicol
PEP	– Fosfoenolpiruvato
PEPC	– Fosfoenolpiruvato carboxilase
PEPCK	– Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
pH	– Potencial hidrogeniônico
PPDK	– Ortofosfato piruvato diquinase
ppm	– Partes por milhão
p/v	– Peso por volume
PVP	– Polivinilpirrolidona
Pyr	– Piruvato
RIDESA	– Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro
RNA	– Ácido ribonucleico
RNAse	– Ribonuclease
RT-qPCR	– PCR quantitativo em tempo real

Rubisco	– Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase
s	– Segundos
SAGE	– Serial Analysis of Gene Expression (Análise de série da expressão de genes)
TBE	– Tris / Ácido bórico / EDTA
Tris-HCl	– Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreídrico
Triton	– 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol
U	– Unidade de enzima
v/v	– Volume por volume
°C	– grau Celsius
$\psi_f$	– Potencial de água foliar
$\mu\text{g}$	– Microgramas
$\mu\text{L}$	– Microlitros
$\mu\text{M}$	– Micromolar
$\mu\text{mol}$	– Micromol

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Três subtipos bioquímicos para a fixação de carbono e descarboxilação em plantas C <sub>4</sub> .....	24
FIGURA 2 - Duas opções para o mecanismo fotossintético C <sub>4</sub> subtipo NADP-ME onde o aspartato (setas azuis), em adição ao malato (setas pretas), é produzido no mesofilo.....	27
FIGURA 3 - Potencial de água foliar ( $\psi_f$ ) para dois genótipos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes níveis de estresse hídrico.....	44
FIGURA 4 - Trocas gasosas foliares de dois genótipos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes níveis de estresse hídrico.....	46
FIGURA 5 - Expressão de genes da via C <sub>4</sub> de dois genótipos de cana-de-açúcar em diferentes níveis de estresse hídrico.....	50
FIGURA 6 - Atividade das enzimas NADP-ME, NAD-ME, PEPCK, AspAT e AlaAT em dois genótipos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes níveis de estresse hídrico.....	53

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Sequência dos iniciadores dos genes e isoformas.....	40
TABELA 2 - Área foliar ( $A_f$ , $\text{cm}^2$ ), massa seca foliar ( $MSF$ , kg), massa seca da raiz ( $MSR$ , kg), massa seca do colmo ( $MSC$ , kg) e massa seca total ( $MST$ , kg) de dois genótipos de cana-de-açúcar submetidos a 100% (irrigado) e 30% da capacidade de campo por 3 e 12 dias.....	47

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	18
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	18
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
<b>3.1</b>	<b>Cana-de-açúcar (<i>Saccharum spp.</i>)</b> .....	19
<b>3.2</b>	<b>Genótipos (<i>Saccharum spp.</i>)</b> .....	20
3.2.1	Genótipo RB92579.....	21
3.2.2	Genótipo SP80-3280.....	21
<b>3.3</b>	<b>Mecanismos bioquímicos da fotossíntese C4</b> .....	21
<b>3.4</b>	<b>Flexibilidade dos mecanismos de descarboxilação e translocação dos ácidos C4</b> .....	24
<b>3.5</b>	<b>Deficiência hídrica</b> .....	28
<b>3.6</b>	<b>Análise de expressão gênica</b> .....	30
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
<b>4.1</b>	<b>Condução do experimento</b> .....	31
<b>4.2</b>	<b>Avaliações fisiológicas</b> .....	33
4.2.1	Estado hídrico das plantas.....	33
4.2.2	Trocas gasosas foliares.....	33
<b>4.3</b>	<b>Biomassa</b> .....	33
<b>4.4</b>	<b>Seleção de genes candidatos envolvidos na regulação do acúmulo de proteínas fotossintéticas em cana-de-açúcar</b> .....	34
<b>4.5</b>	<b>Busca e análise de sequências ESTs de genes candidatos</b> .....	34
<b>4.6</b>	<b>Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores</b> .....	35
<b>4.7</b>	<b>Extração de RNA</b> .....	36
<b>4.8</b>	<b>Síntese de cDNA</b> .....	37
<b>4.9</b>	<b>PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)</b> .....	38
4.9.1	Eficiência dos iniciadores.....	38
4.9.2	Análise da expressão gênica.....	39
<b>4.10</b>	<b>Atividades enzimáticas</b> .....	41
4.10.1	Extração de enzimas.....	41
4.10.2	Análises das atividades enzimáticas.....	41
<b>4.11</b>	<b>Conteúdo de clorofila total</b> .....	43
<b>4.12</b>	<b>Análise estatística</b> .....	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	44
<b>5.1</b>	<b>Avaliações fisiológicas</b> .....	44
<b>5.2</b>	<b>Biomassa</b> .....	46
<b>5.3</b>	<b>Análise da expressão gênica por RT-qPCR</b> .....	48
<b>5.4</b>	<b>Atividades enzimáticas</b> .....	51
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>6.1</b>	<b>Avaliações fisiológicas</b> .....	54

<b>6.2</b>	<b>Biomassa.....</b>	<b>56</b>
<b>6.3</b>	<b>Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....</b>	<b>57</b>
<b>6.4</b>	<b>Atividades enzimáticas.....</b>	<b>59</b>
<b>6.5</b>	<b>A cana-de-açúcar pertence ao subtipo NADP-ME clássico?.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>79</b>
	ANEXO A – Análise química do solo utilizado no experimento.....	79
	ANEXO B – Curvas de <i>melting</i> dos iniciadores dos genes da via fotossintética C4.....	81
	ANEXO C – Ciclo de quantificação ( $C_q$ ) de genes envolvidos na fotossíntese em cana-de-açúcar (3 amostras para cada gene). O gráfico Boxplot mostra os valores medianos como linhas na caixa. As caixas inferior e superior indicam os quartis 1 e 3, respectivamente. As barras representam os limites superior e inferior.....	82



## 1 INTRODUÇÃO

O principal fator determinante do rendimento das culturas é a taxa cumulativa de fotossíntese durante o período vegetativo (RICHARDS, 2000). A cana-de-açúcar, a exemplo de outras espécies definidas como plantas com mecanismo fotossintético C<sub>4</sub>, contêm adaptações anatômicas e fisiológicas para otimizar a fixação de CO<sub>2</sub> para a biossíntese de carboidratos. As vias bioquímicas básicas subjacentes a este processo foram subdivididas em dois grandes grupos, de acordo com as espécies de ácidos orgânicos de quatro carbonos produzidas nas células mesofílicas e transportadas para a bainha dos feixes vasculares; o tipo de ácido com três carbonos que retorna para as células do mesófilo; e em três subtipos, de acordo com a enzima utilizada para descarboxilação dos ácidos C<sub>4</sub> na bainha dos feixes vasculares (TAIZ; ZEIGER, 2013; MAIER; ZELL; MAURINO, 2011).

A cana-de-açúcar é considerada uma espécie C<sub>4</sub> subtipo NADP-ME (BOWYER; LEEGOOD, 1997). Entretanto, inúmeras evidências moleculares, bioquímicas e fisiológicas indicam que plantas C<sub>4</sub> do subtipo NADP-ME, como a cana-de-açúcar, poderiam exibir certo nível de flexibilidade na utilização dos três subtipos de descarboxilação (NADP-ME, NAD-ME e PEPCK) e que estes subtipos podem não ser geneticamente determinados de maneira rígida. A flexibilidade na utilização das enzimas de diferentes subtipos C<sub>4</sub> tem consequências diretas nas necessidades energéticas para a fotossíntese (FURBANK, 2011).

Além disso, há a possibilidade destes mecanismos serem controlados de modo diferencial dependendo tanto dos estádios de desenvolvimento das plantas quanto de fatores ambientais. Vários processos que podem contribuir para esta variação natural foram identificados e incluem propriedades cinéticas e regulação de enzimas; níveis transcricionais de genes codificadores de enzimas; respostas desenvolvimentais para o crescimento em diferentes ambientes e regulação das respostas à flutuação das condições ambientais (SASSENATHCOLE; PEARCY, 1994; SHARWOOD; SONAWANE; GHANNOUM, 2014).

Há evidências que a regulação das enzimas associadas à fotossíntese é afetada por estresses abióticos, como a restrição hídrica, um efeito que é parcialmente mediado pelo nível transcricional dos genes que codificam essas enzimas (MCCORMICK; CRAMER; WATT, 2008). Apesar das mudanças na modulação transcricional de genes serem consideradas apenas indicativas de

eventos regulatórios, essas modificações permitem a identificação de alvos potenciais para futuros estudos sobre a regulação das respostas das plantas a estresses abióticos e a manipulação destes processos (MCCORMICK; CRAMER; WATT, 2008).

Diante dos relatos, torna-se importante o estudo com diferentes genótipos de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica para verificação da ocorrência de uma flexibilidade na utilização de diferentes enzimas de descarboxilação no sistema fotossintético C4.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a modulação das vias de descarboxilação da fotossíntese C4 em cana-de-açúcar sob déficit hídrico.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar fisiologicamente genótipos de cana-de-açúcar sob déficit hídrico;
- Avaliar mudanças nas respostas transcricionais de genes e nas atividades de enzimas relacionadas ao mecanismo fotossintético C4 em folhas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico;
- Verificar se há utilização diferencial das enzimas envolvidas nas vias de descarboxilação da fotossíntese C4 em cana-de-açúcar sob déficit hídrico.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Dentre diversos estudos sobre a origem da cana-de-açúcar, considera-se que seu centro de origem seja a Melanésia (Oceania), onde ela foi domesticada e depois disseminada pelo homem por todo o Sudeste Asiático. A região também se tornou centro de diversidade da cultura, especialmente Nova Guiné e Java, na Indonésia (CIB, 2009). A partir daí teve início sua disseminação: na África e Europa pelos árabes, Filipinas pelos chineses, nas Ilhas de Madeira pelos portugueses e em Canárias pelos espanhóis. Em uma de suas expedições, Cristóvão Colombo levou mudas da Ilha de Madeira para as Américas Central e do Sul onde as lavouras se estenderam. No Brasil, Martim Afonso de Sousa, iniciou o cultivo da cana-de-açúcar em 1533, onde fundou na Capitania de São Vicente, no estado de São Paulo, o primeiro engenho para produzir açúcar (SILVA; SILVA, 2012).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é classificada como uma gramínea tropical, semi-perene, que se desenvolve em forma de touceira, onde a parte aérea é formada por colmos, folhas, podendo formar inflorescências, e a subterrânea constituída por raízes e rizoma (ARALDI et al., 2010).

A cana-de-açúcar é uma cultura pertencente à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*. Dentro do seu gênero possui as espécies *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *S. sinensis*, *S. edule* e *S. spontaneum*, sendo *S. officinarum* ( $x = 10$ ,  $2n = 8x = 80$ ) a mais cultivada por apresentar elevado teor de sacarose e baixa quantidade de fibras (PIOVESAN; SANTOS, 2010).

Por ser uma cultura de clima tropical, a cana-de-açúcar se adaptou muito bem no Brasil pelas condições climáticas favoráveis ao seu cultivo e tornou-se uma cultura de grande importância econômica no país e no mundo. É cultivada principalmente como matéria-prima para a produção de açúcar, etanol e vem se destacando na cogeração de energia elétrica através da queima do bagaço (JADOSKI et al., 2010).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com destaque para o estado de São Paulo, responsável por mais de 50% da produção brasileira. Estima-se que na safra 2016/2017 a produção seja de 690 milhões de toneladas de cana no país, um aumento de 3,8% em relação à safra anterior, com uma área

cultivada de mais de 9 milhões de hectares. Além disso, é o maior produtor de açúcar do mundo, representando 20% da produção e 40% da exportação mundial do produto. Em relação ao etanol, o país ocupa a segunda posição no ranking de maiores produtores, ficando atrás somente dos Estados Unidos. Na safra 2016/2017 é estimada uma produção de 37,5 milhões de toneladas de açúcar e mais de 30 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2016).

O setor sucroenergético no Brasil, que envolve as atividades de produção do açúcar, etanol e bioeletricidade através do processamento da cana-de-açúcar, é considerado uma estratégia bem-sucedida de desenvolvimento econômico de um país. Isso se deve ao fato de apresentar uma produção sustentável, principalmente pela utilização dos resíduos industriais no campo, como a vinhaça e a torta de filtro, diminuindo assim a aplicação de fertilizantes químicos e consequentemente contribuindo com questões econômicas, sociais e ambientais (NASTARI, 2012).

### **3.2 Genótipos (*Saccharum* spp.)**

Os genótipos de cana-de-açúcar cultivados são originados a partir de cruzamentos das espécies que pertencem ao gênero *Saccharum*, que tiveram início no século XX na ilha de Java (CIB, 2009). As espécies *S. officinarum* ( $2n = 80$ ) e *S. spontaneum* ( $2n = 40-128$ ) são responsáveis pela maioria dos cruzamentos, sendo que *S. officinarum* é capaz de acumular altos níveis de sacarose, mas é suscetível a doenças, enquanto que *S. spontaneum* possui maior resistência a doenças e problemas no campo, mas baixo teor de sacarose. Com isso, os genótipos obtidos resultaram em elevado teor de sacarose e maior resistência a doenças e fatores climáticos (MORAIS et al., 2015).

Estudos moleculares mostram que a espécie *S. officinarum* possui carga genética dominante em híbridos resultantes de cruzamentos com *S. spontaneum*, contribuindo com cerca de 75% do genoma da planta (ARRUDA, 2001).

Os nomes dos genótipos representam a sigla da instituição que efetuou o cruzamento, o ano em que o mesmo foi realizado e um número sequencial das seleções (VERISSIMO, 2012).

### 3.2.1 Genótipo RB92579

O genótipo RB92579 foi desenvolvido pela RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro), composta por dez universidades federais do país, representada pela sigla 'RB' (República do Brasil). Os genótipos RB já ocupam quase 70% de toda a área de cana-de-açúcar cultivada no Brasil (SINDAÇÚCAR, 2016).

Em 2003, a Universidade Federal de Alagoas liberou para fins comerciais o genótipo RB92579, resultado de um cruzamento biparental (genitores conhecidos) entre RB75126, utilizado como progenitor, fecundado com pólen de RB72199. Possui como principais características: tolerância à seca; alta eficiência no uso da água; resistência a herbicidas, a cigarrinha, a ferrugem e ao carvão; resistência intermediária à escaldadura das folhas e à podridão vermelha; alta produtividade, com bom perfilhamento e porte ereto, facilitando a colheita, considerada média a tardia (RIDESA, 2010).

De acordo com Ferreira Júnior et al. (2012), RB92579 apresenta alto rendimento de colmos e de açúcar devido a sua maior capacidade de rebrotação e eficiência em conversão de energia em fotoassimilados.

### 3.2.2 Genótipo SP80-3280

O genótipo SP80-3280 foi desenvolvido pela Copersucar, que hoje faz parte do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira). Apresenta como características elevada exigência em solos férteis e úmidos, com pouca tolerância à seca (IDEA NEWS, 2004); alto teor de sacarose e produtividade em soqueira; perfilhamento intermediário; crescimento inicial vigoroso; alto teor de fibra; sensibilidade média a herbicidas; resistência ao carvão, mosaico e ferrugem, tolerante à escaldadura; apresenta suscetibilidade à broca e colheita média a tardia (AGEITEC, 2005).

## 3.3 Mecanismos bioquímicos da fotossíntese C4

Grandes esforços estão sendo realizados para melhorar a produção de biomassa em cana-de-açúcar, tanto através do melhoramento tradicional, como também pela utilização conjunta de técnicas moleculares. A busca do entendimento

da regulação do acúmulo de biomassa em plantas submetidas a condições de estresses abióticos tem avançado significativamente nos últimos anos (AZEVEDO et al., 2011).

O principal fator determinante do rendimento das culturas é a taxa cumulativa de fotossíntese durante o período vegetativo. No entanto, a taxa momentânea de fotossíntese por unidade de área foliar não se correlaciona bem com a biomassa produzida (RICHARDS, 2000).

Estudos de plantas cultivadas em CO<sub>2</sub> elevado e de plantas transgênicas com alterações em enzimas envolvidas na fixação de CO<sub>2</sub> apresentaram provas de que a manipulação do processo fotossintético tem um potencial significativo para aumentar o rendimento da cultura (LONG et al., 2006; SOUZA et al., 2008; PARRY et al., 2011). As estratégias e os alvos potenciais para aumentar a fixação de CO<sub>2</sub> pela fotossíntese e como isso pode impactar a produtividade das plantas foram revistos amplamente em trabalhos já publicados (RAINES, 2011; PETERHANSEL, 2011). A maior parte destes estudos são concentrados em plantas modelo, como *Arabidopsis thaliana* (espécie C3) (MCCORMICK; CRAMER; WATT, 2008), sendo que, apesar dos recentes avanços, os mecanismos regulatórios em plantas como a cana-de-açúcar ainda não estão plenamente caracterizados (CASU et al., 2004; ISKANDAR et al., 2011).

A cana-de-açúcar, a exemplo de outras espécies definidas como plantas com mecanismo fotossintético C<sub>4</sub>, contém adaptações anatômicas e fisiológicas para otimizar a fixação de CO<sub>2</sub> para a biossíntese de carboidratos. Essas plantas possuem a chamada 'anatomia Kranz', uma camada de células bem desenvolvidas que envolvem o xilema e floema, conhecidas como células da bainha dos feixes vasculares e que realizam a separação espacial entre as fases de fixação e redução do CO<sub>2</sub>. O CO<sub>2</sub> é fixado pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) nas células do mesófilo, produzindo ácidos C<sub>4</sub> que são transportados para as células da bainha dos feixes vasculares, ocorrendo em seguida a descarboxilação, onde a concentração de CO<sub>2</sub> é maior e este é re-fixado pela Rubisco (FURBANK; HATCH, 1987).

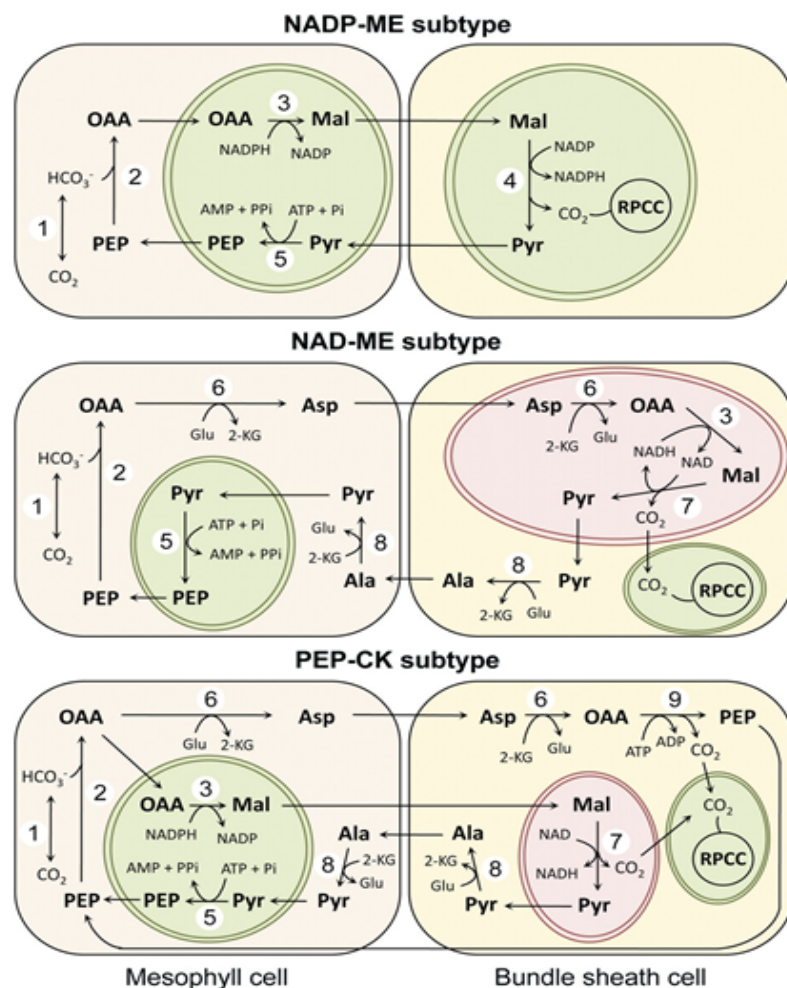
As plantas C<sub>4</sub> foram subdivididas em dois grandes grupos, de acordo com as espécies de ácidos orgânicos de quatro carbonos (malato e/ou aspartato) produzidas nas células mesofílicas e transportadas para a bainha dos feixes vasculares; o tipo de ácido com três carbonos que retorna para as células do

mesofilo (piruvato ou alanina); e em três subtipos, de acordo com a enzima utilizada para descarboxilação dos ácidos C<sub>4</sub> na bainha dos feixes vasculares, que podem ser a enzima málica dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP<sup>+</sup>) (NADP-ME), a enzima málica dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) (NAD-ME) ou a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). A descarboxilação nas células da bainha dos feixes vasculares pode se dar em compartimentos celulares distintos, uma vez que NADP-ME ocorre em cloroplastos; NAD-ME em mitocôndrias, enquanto PEPCK exibe uma atividade citosólica (TAIZ; ZEIGER, 2013; MAIER; ZELL; MAURINO, 2011). A cana-de-açúcar é considerada uma espécie C<sub>4</sub> subtipo NADP-ME (BOWYER; LEEGOOD, 1997).

O ciclo C<sub>4</sub> tem início na fixação de CO<sub>2</sub> nas células do mesofilo pela PEPC, que é uma enzima comum nos três subtipos. O produto gerado é o oxaloacetato (OAA), que pode ser reduzido a malato pela malato desidrogenase dependente de NADP<sup>+</sup> (NADP-MDH) ou convertido em aspartato pela aspartato aminotransferase (AspAT). O malato é transportado para as células da bainha dos feixes vasculares no subtipo NADP-ME, onde é catalisado por essa enzima formando o piruvato e liberando CO<sub>2</sub>. Em seguida, o piruvato retorna para as células do mesofilo e a ortofosfato piruvato diquinase (PPDK) catalisa a reação formando fosfoenolpiruvato (PEP). O aspartato é transportado nos subtipos NAD-ME e PEPCK, é convertido para OAA nas mitocôndrias e no citosol, respectivamente. Em NAD-ME, OAA é reduzido a malato pela NADP-MDH, e NAD-ME catalisa o malato em piruvato e libera CO<sub>2</sub> na mitocôndria. Já em PEPCK, a maior parte do OAA é convertido em PEP pela enzima PEPCK e libera CO<sub>2</sub> no citosol das células da bainha dos feixes vasculares. A enzima NAD-ME é utilizada para fornecer o NADH para a geração de ATP que pode ser utilizado para alimentar a PEPCK. O piruvato resultante pode ser convertido em alanina pela enzima alanina aminotransferase (AlaAT) que volta para as células do mesofilo (FIGURA 1) (HATCH; KAGAWA; CRAIG, 1975; FURBANK, 2011).



FIGURA 1 – Três subtipos bioquímicos para a fixação de carbono e descarboxilação em plantas C4.



Abreviação dos metabólitos: PEP, fosfoenolpiruvato; OAA, oxaloacetato; Asp, aspartato; Ala, alanina; Pyr, piruvato; Mal, malato. Abreviação das enzimas: 1, anidrase carbônica (AC); 2, fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC); 3, NADP-malato desidrogenase (NADP-MDH); 4, enzima málica dependente do  $\text{NADP}^+$  (NADP-ME); 5, ortofosfato piruvato diquinase (PPDK); 6, aspartato aminotransferase (AspAT); 7, enzima málica dependente do  $\text{NAD}^+$  (NAD-ME); 8, alanina aminotransferase (AlaAT); 9, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). RPCC, ciclo do carbono fotossintético redutivo. Cloroplastos e mitocôndrias são representados em verde e vermelho, respectivamente.

Fonte: Maier, Zell e Maurino (2011).

### 3.4 Flexibilidade dos mecanismos de descarboxilação e translocação dos ácidos C4

Embora haja uma gama de propostas sobre quais foram as pressões seletivas que levaram à evolução da via C4, há ainda pouca informação sobre os méritos relativos de cada um dos subtipos de descarboxilação do ponto de vista energético e, portanto, sua vantagem em um contexto ecológico (SAGE, 2004).

O fato de que a maioria das espécies de culturas C4 surgiu do subtipo NADP-ME (milho, sorgo e cana-de-açúcar, por exemplo), proporciona somente evidências circunstanciais para a superioridade desta via (FURBANK, 2011). Assim, há ausência de provas sólidas para a vantagem energética de um subtipo C4 sobre outro, seja na eficiência do uso da radiação ou no desenvolvimento/crescimento das plantas (GHANNOUM; VON CAEMMERER; CONROY, 2001).

Von Caemmerer e Furbank (2003) sugerem que muitos outros fatores desempenham um papel importante na determinação da eficiência fotossintética de plantas C4, incluindo variações na eficiência da interceptação da luz e produção de ATP, no arranjo espacial das organelas e as diferenças morfológicas relacionadas ao fato da presença desses mecanismos em dicotiledôneas ou monocotiledôneas. Portanto, há ainda pouca evidência concreta de vantagens de um tipo de descarboxilação em detrimento de outro em termos de eficiência fotossintética ou vantagem adaptativa.

Furbank (2011), baseado em inúmeras evidências moleculares, bioquímicas e fisiológicas, propôs que plantas C4 do subtipo NADP-ME, como a cana-de-açúcar, poderiam exibir certo nível de flexibilidade na utilização dos três subtipos de descarboxilação e que estes subtipos podem não ser geneticamente determinados de maneira rígida. Como exemplo, estudos de marcação  $C^{14}$  mostraram que nas espécies subtipo NADP-ME aproximadamente 25% dos isótopos foram incorporados em aspartato (HATCH, 1971) e que em experimentos com milho, uma planta plenamente estabelecida como pertencente ao subtipo NADP-ME, proporções significativas de aspartato marcado foram produzidas, como também as células da bainha dos feixes vasculares isoladas podiam usar aspartato e oxoglutarato para gerar  $CO_2$  para manter a fotossíntese (CHAPMAN; HATCH, 1981).

Walker et al. (2002) relataram uma razoável quantidade de PEPCK ativa nas células da bainha dos feixes vasculares em milho, capim-arroz (*Echinochloa colona* e *E. crus-galli*), capim-colchão (*Digitaria sanguinalis*) e grama-batatais (*Paspalum notatum*), espécies reconhecidamente do subtipo NADP-ME, mas não em espécies do subtipo NAD-ME. Em milho, Furumoto, Hata e Izui (2000) detectaram uma alta expressão de PEPCK relacionada à fotossíntese em células da bainha de feixes vasculares.

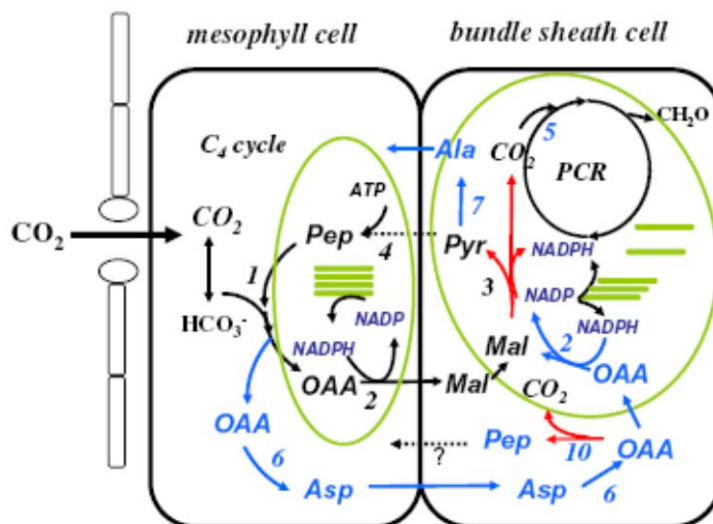
Em cana-de-açúcar, um trabalho utilizando a técnica de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), mostrou que transcritos de PEPCK eram mais

abundantes nas células da bainha dos feixes vasculares do que NADP-ME (CALSA JÚNIOR; FIGUEIRA, 2007).

Furbank (2011) sugere que a chave para o sucesso das culturas agrícolas do subtipo NADP-ME é o grau de flexibilidade nos mecanismos fotossintéticos e propõe duas possibilidades para a contribuição do aspartato para o *pool* de CO<sub>2</sub> nas espécies subtipo NADP-ME. A primeira hipótese prevê que para a PEPCK estar presente em espécies do subtipo NADP-ME, o oxaloacetato (OAA) produzido pela aspartato aminotransferase (AspAT) poderia ser diretamente descarboxilado no citosol. O ATP da qual a PEPCK é dependente, poderia ser proveniente do cloroplasto ao invés da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, como ocorre originalmente. A segunda hipótese leva em conta os dados produzidos por Chapman e Hatch (1981) que mostram que o OAA produzido a partir do aspartato é re-reduzido a malato na bainha do feixe vascular e, em seguida, descarboxilado no cloroplasto pela NADP-ME. Quando o malato é descarboxilado pela enzima NADP-ME há produção de NADPH que pode ser utilizada no ciclo de Calvin. Entretanto, quando o aspartato é translocado para células da bainha dos feixes vasculares, o NADPH produzido é gasto na redução do OAA.

A PEPCK requer ATP para descarboxilação. Se o PEP tem a capacidade de retornar diretamente para a célula do mesófilo, ele já é utilizado na reação de carboxilação, sem que haja gasto energético. Mas se o piruvato retorna, há gasto de ATP quando ele é convertido em PEP. Entretanto, se o PEP retorna para a célula do mesófilo, não há retorno de um grupo amino (piruvato ou alanina) ocorrendo um desequilíbrio entre os dois compartimentos (FIGURA 2) (FURBANK, 2011).

FIGURA 2 – Duas opções para o mecanismo fotossintético C<sub>4</sub> subtipo NADP-ME onde o aspartato (setas azuis), em adição ao malato (setas pretas), é produzido no mesofilo.



Abreviações: 1, fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC); 2, NADP-malato desidrogenase (NADP-MDH); 3, enzima málica dependente de NADP<sup>+</sup> (NADP-ME); 4, ortofosfato piruvato diquinase (PPDK); 5, Rubisco; 6, aspartato aminotransferase (AspAT); 7, alanina aminotransferase (AlaAT); 10, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). PCR, ciclo do carbono fotossintético redutivo. Cloroplastos representados em verde.

Fonte: Furbank (2011).

Assim, nota-se que a flexibilidade na utilização das enzimas NADP-ME ou PEPCK tem consequências diretas nas necessidades energéticas para a fotossíntese. Além disso, há a possibilidade destes mecanismos serem controlados de modo diferencial dependendo tanto dos estádios de desenvolvimento das plantas quanto de fatores ambientais. Vários processos que podem contribuir para esta variação natural foram identificados e incluem propriedades cinéticas e regulação de enzimas; níveis de transcricionais de genes codificadores de enzimas; respostas desenvolvimentais para o crescimento em diferentes ambientes e regulação das respostas dinâmicas à flutuação das condições ambientais (SASSENATHCOLE; PEARCY, 1994; SHARWOOD; SONAWANE; GHANNOUM, 2014).

Diante dos diversos estudos, está se tornando aparente que, mesmo em muitas espécies C<sub>4</sub> subtipo NADP-ME, tanto a enzima NADP-ME quanto a PEPCK estão presentes na bainha dos feixes vasculares, ambas contribuindo para a descarboxilação dos ácidos C<sub>4</sub>, sendo que essas espécies podem formar malato e/ou asparto, utilizando ambos os metabólitos como o ácido C<sub>4</sub> translocado (BRÄUTIGAM et al., 2014; WANG et al., 2014).

Furbank (2016) afirma que a melhor ou mais eficiente forma de realização da fotossíntese C4 é desconhecida, mas que a facilidade de acesso às novas técnicas na análise da transcrição, sequenciamento de genes e uma combinação de bioquímica tradicional e tecnologia genética, fornecerão dados para compreensão da flexibilidade destas vias em resposta ao ambiente e à eficiência da fotossíntese C4.

### **3.5 Deficiência hídrica**

O entendimento de como as plantas respondem aos estresses ambientais é fundamental para a sustentabilidade de sistemas agrícolas. A tolerância e a sensibilidade da cultura aos diferentes estresses abióticos abrangem uma série de mecanismos de ordem celular, bioquímica e fisiológica da planta (CASTRO; SOUZA, 2015). Os estresses ambientais provocam uma grande variedade de respostas das plantas, alterando a expressão gênica, o metabolismo celular, crescimento e produtividade (ANJUM et al., 2011).

A primeira etapa, responsável pelo desencadeamento de todo o processo de ativação de genes e expressão diferencial de proteínas, envolve a percepção celular e a transdução do sinal biológico provido do ambiente em informação química. A partir daí, ocorre a ativação de uma cascata de genes que codificam proteínas com funções enzimática e estrutural, bem como de proteínas regulatórias envolvidas direta e indiretamente no controle de processos fisiológicos e do desenvolvimento da planta (NAKASHIMA; ITO; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2009).

As respostas das plantas à deficiência hídrica são moduladas pela intensidade, duração e a taxa de progresso das condições de seca. Durante o processo de resposta, um grande número de genes é induzido. Estes genes são classificados em dois grandes grupos de acordo com as suas características funcionais: 1. genes que codificam proteínas estruturais; 2. genes que regulam a expressão gênica e a transdução de sinais de resposta a estresses (BAILLY et al., 2000; XIONG; ZHU, 2001; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

Em cana-de-açúcar, vários genes induzidos por déficit hídrico têm sido identificados e caracterizados (ROCHA et al., 2007; ISKANDAR et al., 2011) e a função desses genes examinada através de testes funcionais em plantas geneticamente modificadas (MOLINARI et al., 2007; TRUJILLO et al., 2008).

A fotossíntese é afetada de maneira significativa pelo déficit hídrico, o que restringe as funções normais de outras vias metabólicas. Os efeitos da seca na fotossíntese são diretos, como as limitações de difusão através dos estômatos e do mesofilo e as alterações no metabolismo fotossintético, ou secundários, como o estresse oxidativo resultante da superposição de múltiplos estresses. A eficiência fotossintética depende muito da atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco). O fechamento dos estômatos reduz o suprimento de CO<sub>2</sub> para Rubisco, o que predispõe o aparato fotossintético a aumentar a dissipação de energia e regulação da fotossíntese quando as plantas são submetidas à seca (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009).

Estudos mostram que o estresse hídrico severo reduz significativamente a condutância estomática, transpiração, fotossíntese líquida e a eficiência no uso da água na cultura da cana-de-açúcar, além de causar reduções nos pigmentos fotossintéticos e biomassa (GONÇALVES et al., 2010; SILVA et al., 2014).

Em estudo usando três diferentes gramíneas C<sub>4</sub>, *Paspalum dilatatum* (NADP-ME), *Cynodon dactylon* (NAD-ME) e *Zoysia japonica* (PEPCK) ficou demonstrado que as enzimas do mecanismo C<sub>4</sub> que concentra o CO<sub>2</sub> podem ser afetadas, limitando a fotossíntese em condições de déficit hídrico (CARMO-SILVA et al., 2008). Estes autores relataram que a desidratação moderada das folhas afetou a atividade e regulação da PEP carboxilase (PEPC) similarmente nas três gramíneas, mas teve um efeito espécie-específico nas descarboxilases do sistema C<sub>4</sub>, NADP-ME, NAD-ME e PEPCK. Em todas as três espécies, o estado de fosforilação da PEPC aumentou com a deficiência hídrica, promovendo a maior assimilação de CO<sub>2</sub> pela enzima em condições de estresse. A flexibilidade na utilização dos três subtipos de descarboxilação também foi notada, pois uma razoável atividade da PEPCK foi observada em todas as três espécies, sugerindo que esta enzima pode atuar como uma descarboxilase complementar para NADP-ME e NAD-ME em adição ao seu papel em outras vias metabólicas.

É amplamente reconhecido que em plantas submetidas a vários tipos de estresses abióticos, tais como a seca, concentração salina elevada, ausência de fósforo e de ferro ou ainda a presença de metais pesados no solo, maiores atividades de PEPC, NADP-ME e ortofosfato piruvato diquinase (PPDK) são encontradas e que as funções dessas enzimas parecem ser mais importantes para

as plantas sob estresses do que quando em condições ideais de crescimento (DOUBNEROVÁ; RYSLAVÁ, 2011).

### **3.6 Análise de expressão gênica**

O acúmulo de dados obtidos em projetos de sequenciamento de ESTs (Expressed sequence tags) fez dessa metodologia uma rota importante para estudos de expressão gênica em plantas. Inúmeros exemplos da aplicação de ESTs para identificação de genes e comparação de padrões de expressão entre tecidos ou estádios de desenvolvimento de plantas têm sido publicados (ARRUDA, 2001).

Análises de expressão gênica são cada vez mais importantes no campo de pesquisas biológicas. Entender os padrões de expressão dos genes pode levar a uma série de descobertas de complexos mecanismos regulatórios que provavelmente propiciarão a identificação de genes relevantes em processos biológicos (VANDESOMPELE et al., 2002).

O PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) tem se mostrado um método bastante sensível para medir os níveis de expressão gênica (CZECHOWSKI et al., 2005) e é frequentemente usado para confirmar resultados obtidos através de hibridização por microarranjos, assim como para realizar estudos mais profundos de um determinado número de genes entre vários tratamentos e tecidos (LIBAULT et al., 2008). A técnica de RT-qPCR é um dos métodos mais utilizados para a quantificação da expressão de genes devido à sua dinamicidade, sensibilidade, especificidade, não necessidade de processos pós-amplificação e alta reprodutibilidade (WONG; MEDRANO, 2005). Esta metodologia passou a ser utilizada para monitorar expressão gênica em plantas por sua capacidade de discriminar genes relacionados e de baixa expressão (GACHON; MINGAN; CHARRIER, 2004; CZECHOWSKI et al., 2005).

Análises do nível de expressão de genes permitem avaliar qualitativa e quantitativamente mudanças espaciais e temporais dos padrões do perfil de transcrição em plantas submetidas a estresses ambientais. Nas plantas, há evidências de que a regulação das enzimas associadas à fotossíntese é afetada por estresses abióticos, como restrições hídricas, um efeito que é parcialmente mediado pelo nível transcricional dos genes que codificam essas enzimas (MCCORMICK; CRAMER; WATT, 2008).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Condução do Experimento

O experimento foi realizado no Campus II da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), em Presidente Prudente – SP, em condições de casa de vegetação climatizada, localizada a 22°06'59"S, 51°27'02"W e altitude de 475 m, durante o período de abril a dezembro de 2015.

As mudas utilizadas no experimento foram fornecidas pelo IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná). Os genótipos foram coletados através de corte manual com facão desinfetado com fogo e, após o corte, os colmos foram despalhados manualmente e cortados em toletes de uma gema (aproximadamente 7 cm). No corte dos toletes, o terço inferior e superior do colmo foram descartados, aproveitando somente o terço médio. Os toletes foram selecionados, eliminando gemas brocadas, danificadas e que estavam em início de brotação. Após a seleção, foram submetidos ao tratamento térmico em água a 52°C durante 30 min para o controle da doença bacteriana “raquitismo da soqueira” (*Leifsonia xyli*) (SANGUINO et al., 1988, 1996). Em seguida, os toletes foram resfriados em temperatura ambiente durante 30 min, e logo após foi realizado o plantio em copos plásticos de 700 mL, com perfurações na parte inferior para drenagem do excesso de água. No fundo dos recipientes foi colocado uma camada de 1 cm de pedra brita e o restante preenchido com substrato, sendo o plantio realizado a uma profundidade de 5 a 7 cm.

A parcela experimental foi constituída por vasos plásticos contendo 13 kg de solo, classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo Eutrófico de textura média (EMBRAPA, 2008), ao qual realizou-se a análise química (ANEXO A).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x4, com três repetições por tratamento, totalizando vinte e quatro parcelas. Foram utilizados dois genótipos de cana-de-açúcar, sendo eles, RB92579 (tolerante ao déficit hídrico) e SP80-3280 (suscetível ao déficit hídrico), conforme descrito em Ridesa (2010) e Idea News (2004); e quatro tratamentos com diferentes níveis de estresse hídrico: controle (condições normais de suprimento de água), estresse moderado, estresse severo e recuperação (48 hrs após reidratação).



Os níveis de estresse foram determinados de acordo com estudos realizados por Inman-Bamber e Smith (2005), que mostraram que o potencial hídrico da cana-de-açúcar com boa disponibilidade hídrica pode atingir -0,5 MPa, enquanto sob deficiência hídrica apresenta valores entre -1,5 a -2,0 MPa. A partir dessa informação foi estabelecida uma faixa de valores para os níveis de estresse moderado (-1,5 a -1,8 MPa) e severo (abaixo de -2,0 MPa), onde as plantas foram mantidas sob deficiência hídrica aplicando 30% da capacidade de campo.

As mudas foram transferidas para os vasos cerca de 75 dias após o plantio dos toletes (DAP). Foram realizadas duas adubações de cobertura com o fertilizante 20-00-20 aplicando-se 5 g/vaso, sendo uma aos 135 DAP e outra aos 165 DAP. Semanalmente era realizada a retirada de novos perfilhos, deixando apenas o colmo principal. O déficit hídrico foi induzido aos 210 DAP, na fase de alongamento do colmo. Os vasos do tratamento controle foram mantidos com 100% da capacidade de campo. Nos tratamentos com déficit hídrico, a irrigação foi suspensa até o solo atingir 30% da capacidade de campo. Os vasos dos tratamentos com déficit hídrico foram então mantidos a 30% da capacidade de campo, sendo a reposição de água realizada de acordo com a pesagem diária dos vasos e reposição da água evapotranspirada.

A partir do momento em que os vasos atingiram 30% da capacidade de campo, o potencial de água foliar dos genótipos foi monitorado diariamente e ao atingirem os níveis de estresse estabelecidos foi coletada a folha +1, que se trata da primeira folha totalmente expandida de cada planta, sempre no mesmo período do dia, entre as 13:00 e 15:00 hrs, com temperatura entre 28 e 30°C e com luminosidade similar ( $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). As folhas do tratamento controle foram coletadas no mesmo dia da coleta do estresse moderado. Os dois genótipos atingiram os níveis de estresse estabelecidos ao mesmo tempo, sendo que o nível de estresse moderado ocorreu três dias após a imposição do déficit e o nível de estresse severo ocorreu nove dias após o moderado, totalizando doze dias de estresse hídrico. Ao final desse período de estresse, assim que os genótipos atingiram o estresse severo, as plantas foram reidratadas e as amostras do tratamento de recuperação foram coletadas 48 hrs após a reidratação. As amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o momento das análises. Após a recuperação, as plantas foram coletadas para análise de biomassa.

## 4.2 Avaliações fisiológicas

### 4.2.1 Estado hídrico das plantas

O estado hídrico das plantas foi avaliado através do potencial de água foliar ( $\psi_f$ , MPa), medido com uma câmara de pressão (PMS 1000, PMS Instruments, EUA), em uma folha do terço médio das plantas, sempre as 13:00 hrs. Na câmara de pressão é estimado o valor negativo da pressão necessária para que a água atinja a superfície do xilema exposta à pressão atmosférica (KIRKHAM, 2005).

### 4.2.2 Trocas gasosas foliares

As análises de trocas gasosas foliares foram realizadas assim que as plantas atingiram os níveis de estresse hídrico estabelecidos, logo após a medida do potencial de água foliar. Em cada nível de estresse, entre as 13:00 e 15:00 hrs, antes da coleta das folhas, a medida foi realizada utilizando a folha +1, avaliando medidas pontuais de fotossíntese ( $A$  – assimilação líquida de  $\text{CO}_2$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $G_s$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Para estas avaliações utilizou-se o analisador de gases por infravermelho (Li-6400XTR, LI-COR, EUA), sob irradiação de  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e concentração de  $\text{CO}_2$  de 400 ppm.

## 4.3 Biomassa

Ao final da imposição do déficit hídrico realizou-se a coleta das plantas para a avaliação do efeito do estresse na biomassa. Foram avaliadas as plantas que foram irrigadas durante todo o experimento, plantas que permaneceram três dias sob estresse (quando atingiram o estresse moderado) e doze dias sob estresse (quando atingiram o estresse severo). Avaliou-se massa seca total ( $MST$ , kg), através da massa seca foliar ( $MSF$ , kg), massa seca do colmo ( $MSC$ , kg), massa seca da raiz ( $MSR$ , kg) e área foliar total por planta ( $Af$ ,  $\text{cm}^2$ ).  $Af$  foi medida com um analisador portátil (Li-3000A, LI-COR, EUA). Para a obtenção da  $MSF$  e  $MSR$ , as folhas e raízes foram armazenadas em sacos de papel e mantidas em estufa sob

uma temperatura de 60°C até obtenção de massa constante, utilizando uma balança de precisão para as medidas.

Para obtenção da *MSC*, os colmos foram pesados logo após o corte das plantas (massa fresca do colmo, *MFC*). Após a pesagem, os colmos foram desfibrados em um triturador forrageiro, e em seguida foi coletado 100 g de colmo triturado de cada amostra. Essas amostras foram secas em estufa Spencer (TE-060, Tecnal, Piracicaba) onde permaneceram durante 30 min a 120°C e foram pesadas novamente para obtenção da massa seca. Através da equação:  $100 - \text{massa seca}$ , foi determinada a umidade de cada amostra. De posse do teor de umidade do colmo, foi calculada a massa seca do colmo conforme a equação:  $MSC = (100 - \text{umidade} / 100) \times MFC$  (FERNANDES, 2003).

#### **4.4 Seleção de genes candidatos envolvidos na regulação do acúmulo de proteínas fotossintéticas em cana-de-açúcar**

Foram avaliados os perfis transcricionais dos genes codificadores das enzimas: 1, *NADP-ME* (enzima málica dependente do  $\text{NADP}^+$ ); 2, *NAD-ME* (enzima málica dependente do  $\text{NAD}^+$ ); 3, *PEPCK* (fosfoenolpiruvato carboxiquinase); 4, *AspAT* (aspartato aminotransferase); 5, *AlaAT* (alanina aminotransferase); 6, *PEPC* (fosfoenolpiruvato carboxilase); 7, *NADP-MDH* (NADP-malato desidrogenase); 8, *PPDK* (ortofosfato piruvato diquinase). Estes genes foram escolhidos fundamentalmente por seu papel nos diferentes subtipos de mecanismos fotossintéticos C4 (ROCHA et al., 2007; ISKANDAR et al., 2011).

#### **4.5 Busca e análise de sequências ESTs de genes candidatos**

Dentre as espécies gramíneas com genoma completamente sequenciado, o sorgo (*Sorghum bicolor*) é a espécie com maior colinearidade de genoma com relação à cana-de-açúcar e a que possui ancestralidade comum mais próxima (WANG et al., 2010; SETTA et al., 2014). Em razão disso, a identificação de transcritos de cana-de-açúcar relacionados à síntese das enzimas do mecanismo fotossintético C4 tiveram como ponto de partida genes de sorgo.

Os ortólogos em sorgo selecionados são prováveis isoformas relacionadas ao metabolismo C4 com base em análise filogenética proposta por

Christin et al. (2013; 2015). As sequências da região codificante de cada gene de sorgo foram utilizadas como sondas eletrônicas (*queries*) contra ESTs de cana-de-açúcar via ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Foram utilizados dois bancos de dados de ESTs da variedade SP80-3280: uma montagem de sequências codificantes completas obtidas pela tecnologia 454 (NISHIYAMA JÚNIOR et al., 2014) e a montagem de *Saccharum officinarum* disponível no “Gene Indices Database” ([ftp://occams.dfci.harvard.edu/pub/bio/tgi/data/Saccharum\\_officinarum/](ftp://occams.dfci.harvard.edu/pub/bio/tgi/data/Saccharum_officinarum/)).

Foi utilizado como transcrito de referência aquele que, em procura por BLASTN nos dois bancos de dados, apresentasse maior similaridade e cobertura. Os transcritos obtidos foram confrontados com as sequências do genoma do sorgo disponível no GenBank usando BLASTX, garantindo que o transcrito selecionado fosse o melhor *hit* contra seu ortólogo em sorgo. Suplementarmente, as sequências de sorgo foram alinhadas com os *contigs* correspondentes aos genes de cana-de-açúcar através do programa ClustalW – Multiple Sequence Alignment (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) visando verificar a similaridade entre ambos.

A partir das sequências de aminoácidos de cada enzima foi verificada a possível presença de peptídeos sinais utilizando os programas MultiLoc2 (BLUM; BRIESEMEISTER; KOHLBACHER, 2009) e TargetP (EMANUELSSON et al., 2000) para identificar a localização subcelular das proteínas.

#### 4.6 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

As sequências dos genes que possuíam mais de uma isoforma (*NAD-ME* e *AspAT*) foram alinhadas através do programa ClustalW para identificar regiões conservadas e desenhar iniciadores específicos para cada isoforma. Para o desenho foi utilizado o programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (UNTERGASSER et al., 2007). Buscou-se escolher iniciadores com temperatura de anelamento de 57 a 60°C, *amplicons* de 80 a 120 pares de bases, comprimento de 20 a 23 pares de bases e conteúdo GC de 40 a 80%. Para a prevenção de regiões de pareamento não específico, todos os pares de iniciadores foram confrontados com sequências de *Saccharum* spp. depositadas no GenBank para confirmar sua especificidade através do programa PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Também, os iniciadores foram

avaliados utilizando o Multiple Primer Analyzer (ThermoFisher) (<https://www.thermofisher.com/multiple-primer-analyzer.html>) para verificar a formação de dímeros e de *hairpins*.

#### 4.7 Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de tecido foliar, retirados do terço médio das folhas, e macerados com nitrogênio líquido em almofariz com auxílio de pistilo, utilizando o reagente Pure Link Plant™ RNA Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conforme protocolo da empresa fabricante. Adicionou-se 0,5 mL do reagente gelado (4°C) em um microtubo com o macerado e a amostra foi agitada incubando-se por 5 min a temperatura ambiente. Centrifugou-se a amostra por 15 min a 12.000 *g* em temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Em seguida, acrescentou-se 0,1 mL de NaCl (5 M) e 0,3 mL de clorofórmio ao extrato, misturando por inversão. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 12.000 *g* a 4°C para separar as fases, sendo que a fase superior (aquosa) foi transferida para outro microtubo logo após a centrifugação e adicionou-se igual volume de álcool isopropílico. A mistura foi mantida em repouso por 10 min a temperatura ambiente. Novamente foi realizada uma centrifugação seguindo as mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado, tomando cuidado para não perder o *pellet*, e adicionou-se 1 mL de etanol 75%. Centrifugou-se a temperatura ambiente por 1 min a 12.000 *g* e retirou-se o líquido, seguindo de uma breve centrifugação (*spin*) para retirar o líquido residual com auxílio da micropipeta. Adicionou-se 20 µL de água tratada com DEPC (0,1%) para ressuspender o RNA total extraído.

As amostras foram tratadas com a enzima Turbo DNase (Ambion) para eliminar contaminação com DNA genômico que possa ter restado da extração, seguindo o protocolo do fabricante. Para tanto, adicionou-se em cada amostra 2 µL do 10X Turbo DNase Buffer (1 vez a concentração da amostra) e 1 µL da enzima Turbo DNase (2 U), incubando a 37°C por 30 min. Para inativação da enzima, acrescentou-se 3 µL de EDTA (15 mM), incubando a 75°C por 10 min.

A concentração do RNA total extraído foi mensurada por espectrofotometria por meio de análise de absorvância no comprimento de onda de 260 nm e sua qualidade estimada na razão 260/280 nm. Após a quantificação, foi

analisada a qualidade (integridade) do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v).

Para verificar possível contaminação da amostra com DNA, estas foram utilizadas para amplificação por PCR com iniciadores do gene normalizador *GAPDH* (TABELA 1). Para a reação de PCR seguiu-se o protocolo do Kit PCR SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizando 15  $\mu\text{L}$  do mix (22 U/mL *Taq* DNA Polimerase, 22 mM Tris-HCl (pH 8,4), 55 mM KCl, 1,65 mM  $\text{MgCl}_2$ , 220  $\mu\text{M}$  de cada dNTP e estabilizantes), 0,4  $\mu\text{L}$  do iniciador senso (5  $\mu\text{M}$ ), 0,4  $\mu\text{L}$  do iniciador antisenso (5  $\mu\text{M}$ ), 250 ng de RNA, completando o volume final com água Milli-Q autoclavada para 20  $\mu\text{L}$ . Em seguida, a reação seguiu as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 60°C por 30 s, extensão a 72°C por 30 s e extensão final a 72°C por 2 min. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) contendo tampão TBE 0,5X, 4  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio (1 mg/mL) e o marcador molecular DNA Ladder 100 pb (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), utilizando 4  $\mu\text{L}$ /linha, para verificar presença de bandas, indicativas de contaminação das amostras por DNA.

#### 4.8 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada seguindo o protocolo do Kit SuperScript IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) partindo de 2  $\mu\text{g}$  de RNA total extraído das folhas, utilizando 1  $\mu\text{L}$  de iniciador oligo d(T) (50 mM), 1  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (10 mM), completando o volume final de cada amostra com água DEPC para 10  $\mu\text{L}$ , além de uma amostra controle sem RNA. Os componentes foram agitados brevemente com o auxílio do vortex e incubados a 65°C por 5 min, seguindo de uma incubação em gelo por 1 min. Em seguida, preparou-se a mistura para reação de transcrição reversa com 4  $\mu\text{L}$  de 5X SuperScript IV Buffer, 1  $\mu\text{L}$  de DTT (100 mM), 1  $\mu\text{L}$  de RNase OUT, 1  $\mu\text{L}$  de SuperScript IV (200 U/ $\mu\text{L}$ ) completando o volume final com água DEPC para 10  $\mu\text{L}$  por amostra e centrifugou-se brevemente. A mistura foi adicionada às amostras que continham o RNA e o controle, incubando logo após a 55°C por 10 min. Realizou-se uma nova incubação a 80°C por 10 min para inativação da enzima. Para finalizar, adicionou-se 1  $\mu\text{L}$  de RNase H por amostra e incubou-se a 37°C por 20 min, visando a degradação do RNA presente no final do processo.

Este cDNA foi submetido a uma reação de PCR com os iniciadores específicos de cada gene (TABELA 1) para verificar se estes amplificavam unicamente o fragmento esperado para cada gene. Para isto, foi feito um *pool*, uma mistura de 2  $\mu\text{L}$  de cada uma das 24 amostras de cDNA. Para a reação de PCR também se seguiu o protocolo do Kit PCR SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizando 15  $\mu\text{L}$  do mix, 1  $\mu\text{L}$  do *pool* de cDNA, 0,4  $\mu\text{L}$  do iniciador senso (5  $\mu\text{M}$ ), 0,4  $\mu\text{L}$  do iniciador antisenso (5  $\mu\text{M}$ ), completando o volume final com água Milli-Q autoclavada para 20  $\mu\text{L}$ , além de uma amostra de controle negativo (sem iniciadores). Em seguida, a reação seguiu as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 57°C por 30 s, extensão a 72°C por 30 s e extensão final a 72°C por 2 min. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) contendo tampão TBE 0,5X, 4  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio (1 mg/mL) e o marcador molecular DNA Ladder 100 pb (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), utilizando 4  $\mu\text{L}/\text{linha}$ .

#### 4.9 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

##### 4.9.1 Eficiência dos iniciadores

As reações de RT-qPCR foram realizadas em placas utilizando 5  $\mu\text{L}$  de SYBR Green, 0,4  $\mu\text{L}$  do iniciador senso (5  $\mu\text{M}$ ), 0,4  $\mu\text{L}$  do iniciador antisenso (5  $\mu\text{M}$ ) (TABELA 1), 1  $\mu\text{L}$  do *pool* de cDNA, completando o volume final para 10  $\mu\text{L}$  com água Milli-Q autoclavada. O *pool* de cDNA foi feito com as 6 amostras do tratamento controle. Incluiu-se também uma amostra de controle negativo (sem cDNA) utilizando os iniciadores do gene *GAPDH*. Cada reação foi montada em triplicata. As placas foram centrifugadas brevemente (*spin*) e analisadas pelo equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), seguindo as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 2 min, anelamento a 95°C por 30 s e extensão a 60°C por 30 s, ciclo este repetido 40 vezes. Ao término da reação, a curva de *melting* foi determinada para cada par de iniciadores visando verificar a presença de somente um pico gene-específico e ausência de dímeros (ANEXO B). Os dados foram exportados para o Excel e a eficiência de amplificação individual de cada par de iniciadores (TABELA 1) foi calculada utilizando o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003).

#### 4.9.2 Análise da expressão gênica

Os perfis transcricionais dos genes selecionados foram detectados a partir do equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando 5 µL de SYBR Green, 0,4 µL do iniciador senso (5 µM), 0,4 µL do iniciador antisenso (5 µM), 1 µL do cDNA 1:5 (v/v), completando o volume final para 10 µL com água Milli-Q autoclavada. Os iniciadores específicos para cada gene estão representados na Tabela 1. Para cada amostra, as reações foram montadas em triplicata para cada uma das três repetições biológicas. A amplificação foi conduzida seguindo as seguintes condições: 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 2 min, anelamento a 95°C por 30 s e extensão a 60°C por 30 s. A quantificação relativa da expressão de cada gene seguiu o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Em todas as análises, os níveis de transcrição dos genes alvo foram normalizados contra o perfil transcricional do gene *GAPDH*. De acordo com Guo et al. (2014), *GAPDH* foi identificado como gene de referência para avaliar a expressão gênica em cana-de-açúcar sob salinidade e déficit hídrico. Como calibrador foi utilizado o tratamento controle do genótipo suscetível ao déficit hídrico (SP80-3280).



TABELA 1 – Sequência dos iniciadores dos genes e isoformas.

Nome do gene	Descrição	ESTs <i>Saccharum spp.</i>	Locus <i>Sorghum bicolor</i>	Iniciador senso (5'-3')	Iniciador antisenso (5'-3')	Amplicon (pb)	Eficiência (%)
<i>NADP-ME</i>	Enzima málica dependente do NADP <sup>+</sup>	comp88554_c0_seq1 <sup>1</sup>	Sb03g003230	GTGAGGCCTGCCAGAAGTAT	CTAGGACCTTCCCCTTGTCC	84	99,0
<i>NAD-ME1</i>	Enzima málica dependente do NAD <sup>+</sup>	comp79553_c1_seq2 <sup>1</sup>	Sb01g017790	TACAGGGGACAGCTGGAGTT	CTCCCACAACGACGATCTTT	102	95,5
<i>NAD-ME2</i>	Enzima málica dependente do NAD <sup>+</sup>	comp83394_c0_seq4 <sup>1</sup>	Sb02g033920	CAGCAGTTCCTGAACATCA	CGCTGGCCTAATGTTATCGT	118	92,5
<i>PEPCK</i>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	comp81929_c0_seq5 <sup>1</sup>	Sb01g040720	CTGTGCGCAGGAGAAAGAACC	CAGATTTGTGCGCGTAGTCA	112	100
<i>AspAT1</i>	Aspartato aminotransferase	comp82581_c0_seq1 <sup>1</sup>	Sb03g035220	GCACAGTCCTCATGCTCAA	AATAGCGAGCAAGTGGCATT	97	93,0
<i>AspAT2</i>	Aspartato aminotransferase	comp83051_c1_seq5 <sup>1</sup>	Sb04g036060	CGCGTTTAACAAAGCAACAG	CCGAGAGAGACTGAATTGTAGC	94	97,0
<i>AlaAT</i>	Alanina aminotransferase	TC113519 <sup>2</sup>	Sb01g023750	TGCCACAGAAAGCAATTGAG	GGACCACGACAATTCCAGTT	99	98,5
<i>PEPC</i>	Fosfoenolpiruvato carboxilase	comp85702_c0_seq1 <sup>1</sup>	Sb10g021330	TGCAGAGAGAGATCCAAGCA	ATCCCATAGCGCATTTTCATC	85	95,5
<i>NADP-MDH</i>	NADP-malato desidrogenase	comp83117_c0_seq2 <sup>1</sup>	Sb07g023910	GAGCTGCTAACCATGCATCA	CCGGTTGGTTCTGTTTGT	109	93,5
<i>PPDK</i>	Ortofosfato piruvato diquinase	comp84917_c0_seq1 <sup>1</sup>	Sb09g019930	ATTCCAGCAACCACATCCTC	ACTTCTGGTACTGGCGTGCT	107	100
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	SCBFFL4116A05.g <sup>3</sup>	-	CACGGCCACTGGAAGCATCCTCAG	TCCTCAGGGTTCCTGATGCC	101	97,5

<sup>1</sup>(NISHIYAMA JÚNIOR et al., 2014); <sup>2</sup>(ESTs obtidos em <ftp://occams.dfci.harvard.edu/pub/bio/tgi/data/>); <sup>3</sup>(Genbank ESTs).

Fonte: Autor.

#### 4.10 Atividades enzimáticas

Os ensaios de atividades enzimáticas foram realizados para as enzimas que caracterizam os três subtipos bioquímicos de descarboxilação da fotossíntese C<sub>4</sub>, NADP-ME (EC 1.1.1.40), NAD-ME (EC 1.1.1.39) e PEPCK (EC 4.1.1.49), e para as aminotransferases AspAT (EC 2.6.1.1) e AlaAT (EC 2.6.1.2).

##### 4.10.1 Extração de enzimas

Amostras correspondentes a 200 mg do terço médio das folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas a -80°C até a extração. Alíquotas de 20 mg foram utilizadas para extração de acordo com Carmo-Silva et al. (2008), com modificações.

Para a extração das enzimas NADP-ME, NAD-ME e PEPCK foi utilizado o tampão contendo 50 mM Bicina-KOH (pH 8,0), 1 mM EDTA, 5% (p/v) PVP 25000, 6% (p/v) PEG 4000, 10 mM DTT, 50 mM 2-mercaptoetanol e 1% (v/v) de coquetel inibidor de proteases (CARMO-SILVA et al., 2008).

Para AspAT e AlaAT foi utilizado o tampão constituído por 10% (v/v) glicerol, 0,25% (p/v) BSA, 0,1% (v/v) Triton X-100, 50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% (v/v) de coquetel inibidor de proteases e 1 mM DTT, de acordo com Gibon et al. (2004), com modificações.

Em todos os casos, a extração foi realizada com tampão de extração gelado e na proporção de 50 vezes do material vegetal inicial (diluição em p/v). Após o extrato ser misturado vigorosamente, o material foi centrifugado a 12.000 g (4°C) por 5 min. O sobrenadante foi mantido no gelo enquanto as subamostras não eram utilizadas para medir as atividades enzimáticas.

##### 4.10.2 Análises das atividades enzimáticas

Foram quantificadas as atividades máximas das enzimas NADP-ME, NAD-ME e PEPCK de acordo com Carmo-Silva et al. (2008), com pequenas modificações. Para a atividade da enzima NADP-ME foi utilizada uma solução de 1,5 mL contendo 50 mM HEPES-KOH pH (8,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM NADP<sup>+</sup>, 5 mM L-malato e 40 µL de extrato foliar. Para NAD-ME utilizou-se uma solução (1,5 mL)

contendo 50 mM de HEPES-KOH pH (7,2), 4 mM  $MnCl_2$ , 0,1 mM CoA, 4 mM  $NAD^+$ , 5 mM L-malato e 40  $\mu$ L de extrato foliar. Em ambas as análises, o extrato foi incubado com todos os reagentes, exceto o substrato, por 3 min a temperatura de 25°C, e a reação foi iniciada com a adição do L-malato.

O ensaio da atividade da enzima PEPCK foi realizado seguindo a direção da carboxilação pela reação de acoplamento com a malato desidrogenase (WALKER et al., 2002), com pequenas modificações (CARMO-SILVA et al., 2008). A PEPCK foi determinada utilizando uma solução de 1,5 mL contendo 100 mM HEPES-KOH (pH 7), 100 mM KCl, 90 mM  $KHCO_3$ , 5 mM  $MgCl_2$ , 2 mM  $MnCl_2$ , 1 mM ADP, 0,2 mM NADH, 12 U malato desidrogenase, 5 mM PEP e 40  $\mu$ L de extrato foliar. O extrato foliar foi incubado junto com todos os reagentes, exceto PEP, por 3 min a temperatura de 25°C, e a reação foi iniciada com a adição de PEP.

Nestes três procedimentos, acompanhou-se por espectrofotometria a 340 nm a variação da absorvância por um minuto imediatamente após o início da adição do substrato.

Para a determinação da atividade da AspAT foi utilizada a metodologia de Yagi et al. (1985) que acopla a produção de oxaloacetato a partir de aspartato e 2-oxoglutarato à oxidação de NADH pela malato desidrogenase. As reações foram realizadas em uma solução contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 50 mM L-aspartato, 10 mM 2-oxoglutarato, 0,07 mM fosfato de piridoxal, 0,1 mM NADH, 2 U de malato desidrogenase e 40  $\mu$ L de extrato foliar em um volume final de 1,5 mL.

O ensaio da atividade da enzima AlaAT foi realizado como descrito por Good e Muench (1992), com modificações. Um volume final de 1,5 mL conteve 10 mM L-alanina, 5 mM 2-oxoglutarato, 0,1 mM NADH, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 U de lactato desidrogenase e 40  $\mu$ L de extrato foliar.

Em ambas as análises, o extrato foliar foi incubado junto com todos os reagentes, exceto 2-oxoglutarato, por 3 min a temperatura de 25°C, e a reação foi iniciada com a adição de 2-oxoglutarato. Acompanhou-se por espectrofotometria a 340 nm a variação da absorvância por 3 min imediatamente após o início da adição do substrato. Utilizou-se a variação média da absorvância de duas réplicas experimentais de cada uma das três repetições biológicas utilizando o mesmo extrato foliar.

#### **4.11 Conteúdo de clorofila total**

As atividades das enzimas foram baseadas no conteúdo de clorofila total. Para isto, o conteúdo de clorofila total foi determinado a partir de 20 mg de tecido foliar mantidos em solução de acetona 80% por 24 hrs a 4°C e protegidos da luz. A determinação foi realizada por espectrofotometria a 645 nm e 663 nm, segundo cálculos propostos por Arnon (1949).

#### **4.12 Análise estatística**

Os dados obtidos a partir das avaliações fisiológicas, biomassa e atividades enzimáticas, foram submetidos à análise de variância pelo teste F e, quando significativas, às médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2010).

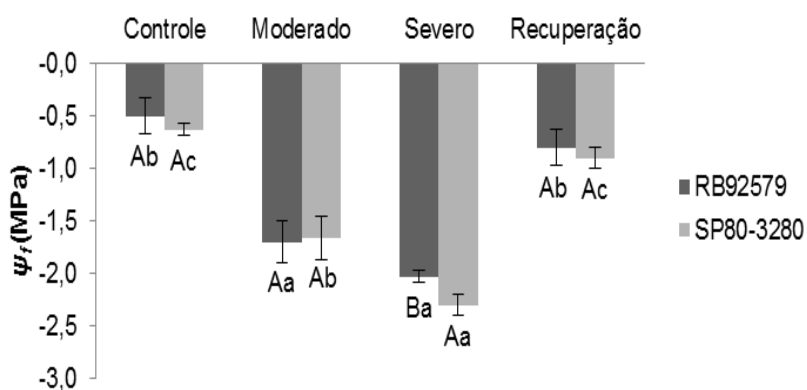
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliações fisiológicas

Em relação ao estado hídrico das plantas, foi estabelecida uma faixa de valores de potencial de água foliar ( $\psi_f$ ) para os níveis de estresse. Como esperado, a deficiência hídrica diminuiu o  $\psi_f$ , e dentro dos valores estabelecidos, as plantas dos dois genótipos atingiram o nível de estresse moderado três dias após a imposição do déficit e o nível de estresse severo ocorreu nove dias após o moderado.

Foi possível observar uma diferença significativa entre os genótipos quando estes atingiram o nível de estresse severo, no décimo segundo dia de estresse. O genótipo SP80-3280 apresentou uma maior redução no  $\psi_f$  (-2,3 MPa) em comparação com o RB92579 (-2,0 MPa), tornando evidente sua menor tolerância ao déficit hídrico. Quando reidratados, ambos os genótipos recuperaram o  $\psi_f$  aos valores observados nas plantas sob condições normais de irrigação (FIGURA 3).

FIGURA 3 – Potencial de água foliar ( $\psi_f$ ) para dois genótipos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes níveis de estresse hídrico.



Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os genótipos (RB92579 e SP80-3280) em cada tratamento e letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tratamentos (controle, moderado, severo e recuperação) para cada genótipo. Valores apresentados como média e expressos em MPa. Barra de erros indica o desvio padrão (n=3). Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Autor.

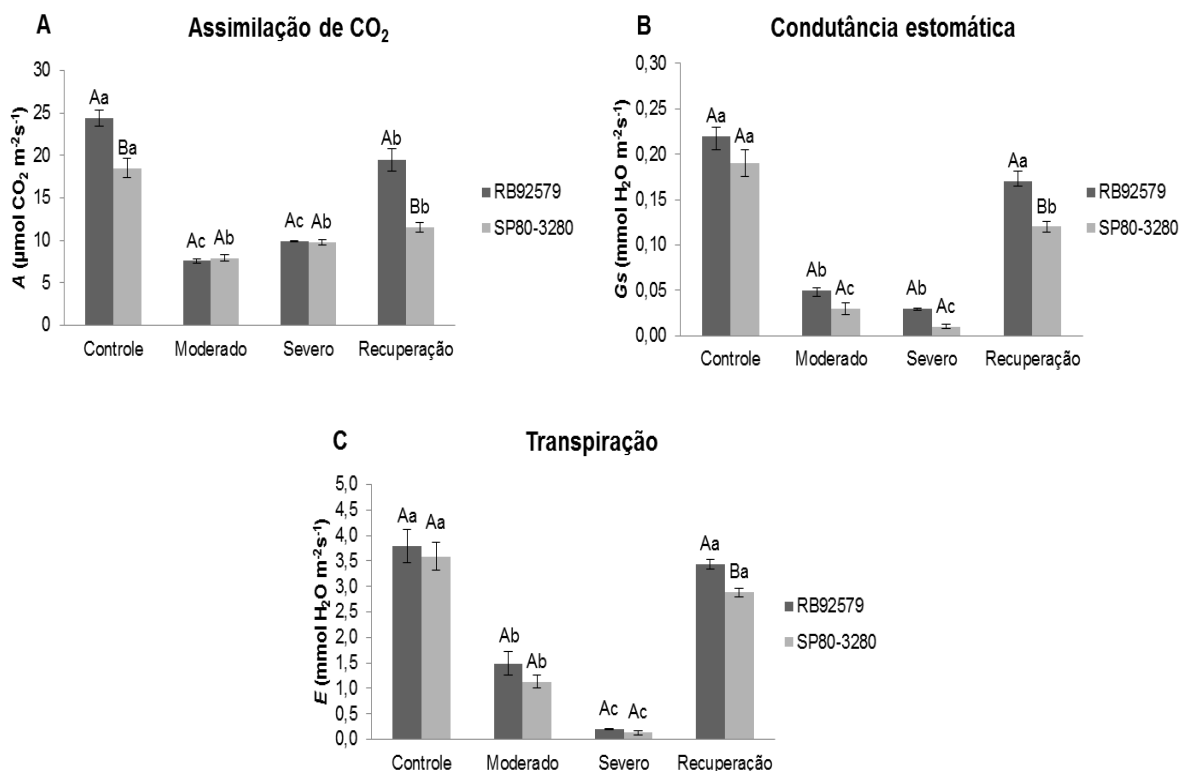
As análises de trocas gasosas foliares mostraram que o estresse hídrico reduziu todos os parâmetros avaliados nos dois genótipos analisados (FIGURA 4).

O genótipo RB92579, tolerante ao déficit hídrico, apresentou maior taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*) em condições normais de suprimento de água e, quando submetidos ao estresse hídrico, os dois genótipos reduziram drasticamente a assimilação (*A*) para 7,56 e 7,92 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, respectivamente, mas não houve diferença significativa entre ambos e entre os tratamentos nos níveis de estresse moderado e severo. O genótipo SP80-3280 manteve baixa atividade fotossintética (em torno de 50% do controle irrigado) mesmo quando submetido à reidratação. Por outro lado, o genótipo tolerante diminuiu quase 60% a *A* quando sob déficit hídrico, mas sua recuperação foi maior após 48 hrs de reidratação (FIGURA 4A).

Como observado na Figura 4B, houve um decréscimo acentuado na condutância estomática (*G<sub>s</sub>*) com a progressão do estresse hídrico nos dois genótipos, sendo que não houve diferença significativa entre estes e entre os tratamentos nos níveis de estresse moderado e severo. Observou-se que no estresse severo a *G<sub>s</sub>* foi menor em relação ao estresse moderado em ambos genótipos, entretanto não foi uma redução significativa. Quando recuperados, o genótipo RB92579 apresentou um aumento maior na *G<sub>s</sub>*. Independentemente dos genótipos, a redução na *G<sub>s</sub>* foi maior do que o declínio de *A*, o que indica que a inibição da fotossíntese pelo déficit hídrico está provavelmente relacionada com o fechamento estomático.

Os níveis de transpiração (*E*) das plantas dos genótipos RB92579 (tolerante ao déficit hídrico) e SP80-3280 (suscetível) foram, respectivamente, 60% e 68% menores no estresse moderado. Ambos reduziram cerca de 95% no estresse severo, sendo que, como nos dois parâmetros anteriores, os níveis de recuperação foram maiores nas plantas do genótipo RB92579 (FIGURA 4C).

FIGURA 4 – Trocas gasosas foliares de dois genótipos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes níveis de estresse hídrico.



A) Assimilação de CO<sub>2</sub> ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), B) Condutância estomática ( $G_s$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), C) Transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os genótipos (RB92579 e SP80-3280) em cada tratamento e letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tratamentos (controle, moderado, severo e recuperação) para cada genótipo. Valores apresentados como média. Barra de erros indica o desvio padrão ( $n=3$ ). Teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

Fonte: Autor.

## 5.2 Biomassa

A deficiência hídrica reduziu todos os parâmetros de biomassa avaliados nos dois genótipos estudados, com destaque para o suscetível ao déficit hídrico (SP80-3280) que exibiu maior queda (TABELA 2).

A área foliar ( $A_f$ ) foi significativamente maior em todos os tratamentos do genótipo SP80-3280. Porém esse genótipo apresentou maior redução neste parâmetro, sendo que ao final do período de estresse apresentou uma diminuição de cerca de 16% quando submetido ao déficit hídrico por somente 3 dias (3 DE) e 38% quando deixado 12 dias sob estresse (12 DE). Nestas mesmas condições, o genótipo RB92579 teve a sua área foliar reduzida em 13% e 35%, respectivamente.

Com relação à massa seca foliar (*MSF*) e massa seca da raiz (*MSR*), não houve diferença significativa entre os genótipos dentro de cada tratamento. Já entre os tratamentos, o genótipo suscetível (SP80-3280) diminuiu 27% de *MSF* e 52% de *MSR* aos 12 DE, sendo que o tolerante (RB92579) teve uma queda menor, de 19% e 45%, respectivamente, neste mesmo período de estresse.

O genótipo SP80-3280 caracterizou-se por possuir maior massa seca do colmo (*MSC*) em condições normais de suprimento de água, o que refletiu também em sua maior massa seca total (*MST*), 14,41% superior em comparação com o tolerante RB92579. Entretanto, quando submetido ao déficit hídrico, o SP80-3280 mostrou uma redução de 36% e 44% da *MSC* no tratamento 3 DE e 12 DE, respectivamente, enquanto o genótipo RB92579 teve um decréscimo no acúmulo de *MSC* de apenas 19% após 3 DE e não diferiu estatisticamente quando deixado 12 dias em condições de déficit hídrico (12 DE). Ao final dos 12 dias de déficit hídrico, o acúmulo de *MST* foi 42% menor no genótipo SP80-3280 e 30% no RB92579 em comparação com o tratamento irrigado.

TABELA 2 – Área foliar (*Af*, cm<sup>2</sup>), massa seca foliar (*MSF*, kg), massa seca da raiz (*MSR*, kg), massa seca do colmo (*MSC*, kg) e massa seca total (*MST*, kg) de dois genótipos de cana-de-açúcar submetidos a 100% (irrigado) e 30% da capacidade de campo por 3 e 12 dias.

Genótipo	RB92579			SP80-3280			
	Tratamento	Irrigado	3 DE	12 DE	Irrigado	3 DE	12 DE
<i>Af</i> (cm <sup>2</sup> )		2658,51 Ba	2313,00 Ba	1727,82 Bb	3316,84 Aa	2776,82 Ab	2058,72 Ac
<i>MSF</i> (Kg)		0,120 Aa	0,111 Aa	0,097 Ab	0,125 Aa	0,115 Aa	0,091 Ab
<i>MSR</i> (Kg)		0,141 Aa	0,123 Aa	0,077 Ab	0,163 Aa	0,123 Ab	0,079 Ac
<i>MSC</i> (Kg)		0,197 Ba	0,160 Ab	0,145 Ab	0,236 Aa	0,151 Ab	0,133 Ac
<i>MST</i> (Kg)		0,458 Ba	0,394 Ab	0,319 Ac	0,524 Aa	0,389 Ab	0,303 Ac

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os genótipos (RB92579 e SP80-3280) em cada tratamento e letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tratamentos (irrigado, 3 DE e 12 DE) para cada genótipo. DE – dias de estresse, onde plantas permaneceram por 3 e 12 dias sob 30% da capacidade de campo. Valores apresentados como média. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Autor.



### 5.3 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Para verificar a resposta de genes envolvidos nos três subtipos bioquímicos da via fotossintética C4 sob déficit hídrico foi realizada a expressão de oito genes, *NADP-ME*, *NAD-ME*, *PEPCK*, *AspAT*, *AlaAT*, *PEPC*, *NADP-MDH* e *PPDK* por RT-qPCR.

O gene *NADP-ME* foi mais expresso no genótipo mais suscetível ao déficit hídrico (SP80-3280) tanto em plantas irrigadas como nos dois níveis de supressão de água, sendo que a maior expressão foi detectada no estresse severo e na recuperação. O número de transcritos deste gene no genótipo tolerante (RB92579) teve somente um pequeno aumento nas plantas sob condição de estresse mais severo e nas plantas reidratadas.

As duas isoformas do gene *NAD-ME* (ambas mitocondriais) foram mais expressas no genótipo suscetível (SP80-3280) em todos os tratamentos. Para a isoforma *NAD-ME1*, este genótipo manteve a expressão similar em todos os níveis de estresse hídrico, enquanto que para a isoforma *NAD-ME2* mostrou um aumento na expressão relacionada à intensidade do estresse e uma queda na recuperação. Já o genótipo tolerante (RB92579) exibiu um perfil transcricional para o gene que codifica a isoforma *NAD-ME1* similar ao observado para o suscetível, mas mostrou uma redução gradativa do número de transcritos da isoforma *NAD-ME2* nos dois níveis de estresse, como também 48 hrs após a reidratação.

O gene *PEPCK* exibiu maior expressão no tratamento controle (condições normais de suprimento de água) nos dois genótipos. Quando submetido ao estresse hídrico, o genótipo RB92579 (tolerante) reduziu o número de transcritos com o aumento do nível de estresse e quando recuperado apresentou um incremento na expressão, porém inferior às plantas irrigadas. O genótipo suscetível (SP80-3280) também reduziu a expressão no estresse moderado, entretanto no nível de estresse severo houve um aumento no número de transcritos que permaneceu na recuperação.

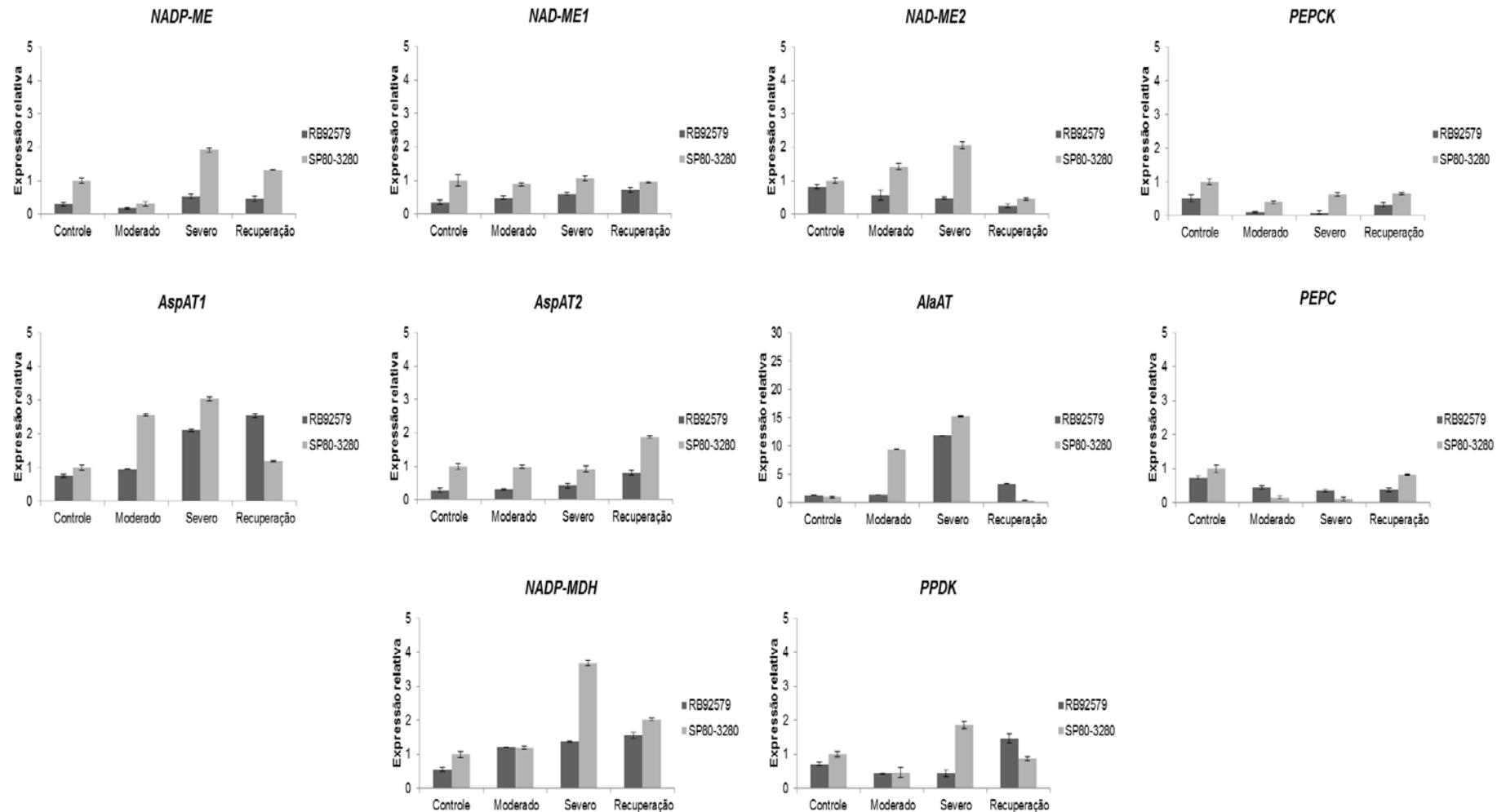
Também foram avaliadas duas isoformas do gene *AspAT* e ambas responderam de forma diferente, sendo que a isoforma *AspAT1* (citosólica) foi mais expressa que a *AspAT2* (mitocondrial). *AspAT1* apresentou um incremento na expressão em todos os níveis de estresse no genótipo tolerante (RB92579), enquanto o suscetível diminuiu na recuperação. *AspAT2*, nos dois genótipos,

manteve a expressão parecida ao tratamento controle nos níveis de estresse moderado e severo, porém na recuperação aumentou em ambos genótipos, sendo maior no suscetível ao déficit hídrico.

Em comparação à expressão dos demais genes aqui estudados, o gene *AlaAT* foi o que apresentou o maior incremento do número de transcritos após os tratamentos de déficit hídrico. Esse gene foi mais expresso no nível de estresse severo em ambos genótipos, sendo quinze vezes maior no SP80-3280 que já apresentou maior expressão no estresse moderado. Na recuperação houve uma queda maior na expressão gênica nesse mesmo genótipo.

O gene *PEPC* exibiu baixo nível transcricional tanto no estresse moderado quanto no severo, sendo menor no genótipo SP80-3280, que na recuperação aumentou a expressão, ao contrário do RB92579 que manteve baixa. A expressão do gene *NADP-MDH* foi crescente a cada nível de estresse no genótipo tolerante (RB92579), enquanto no SP80-3280 houve um aumento no estresse severo (quatro vezes mais expresso) e uma queda na recuperação. O gene *PPDK* reduziu a expressão no estresse moderado nos dois genótipos. No genótipo RB92579, esse gene continuou pouco expresso no estresse severo e aumentou na recuperação, ao contrário do SP80-3280, que aumentou no estresse severo e diminuiu na recuperação (FIGURA 5).

FIGURA 5 – Expressão de genes da via C4 de dois genótipos de cana-de-açúcar em diferentes níveis de estresse hídrico.



Valores apresentados como média através do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Genótipos: RB92579 e SP80-3280, tratamentos: controle, moderado, severo e recuperação. Para os cálculos foi utilizado o gene normalizador *GAPDH* e calibrador o tratamento controle do genótipo suscetível ao déficit hídrico (SP80-3280). Barra de erros indica o desvio padrão (n=3). Fonte: Autor.

#### 5.4 Atividades enzimáticas

O ensaio de atividades enzimáticas foi realizado para cinco enzimas, sendo elas as que caracterizam os três subtipos bioquímicos da via fotossintética C4, NADP-ME, NAD-ME e PEPCK, e as aminotransferases AspAT e AlaAT, pois os genes que as codificam apresentaram um aumento da expressão sob déficit hídrico e essas enzimas estão presentes apenas nos subtipos NAD-ME e PEPCK.

A enzima NADP-ME apresentou maior atividade no nível de estresse severo no genótipo RB92579 ( $6,33 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ ). Dois dias após a reidratação (recuperação), a atividade sofreu uma queda (25%) e ficou estatisticamente semelhante às plantas controle e a menor atividade foi no estresse moderado. No genótipo SP80-3280, a maior atividade dessa enzima foi na recuperação ( $5,71 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ ) em relação ao tratamento controle e ao estresse severo, sendo essa atividade estatisticamente semelhante à encontrada no estresse moderado (FIGURA 6A).

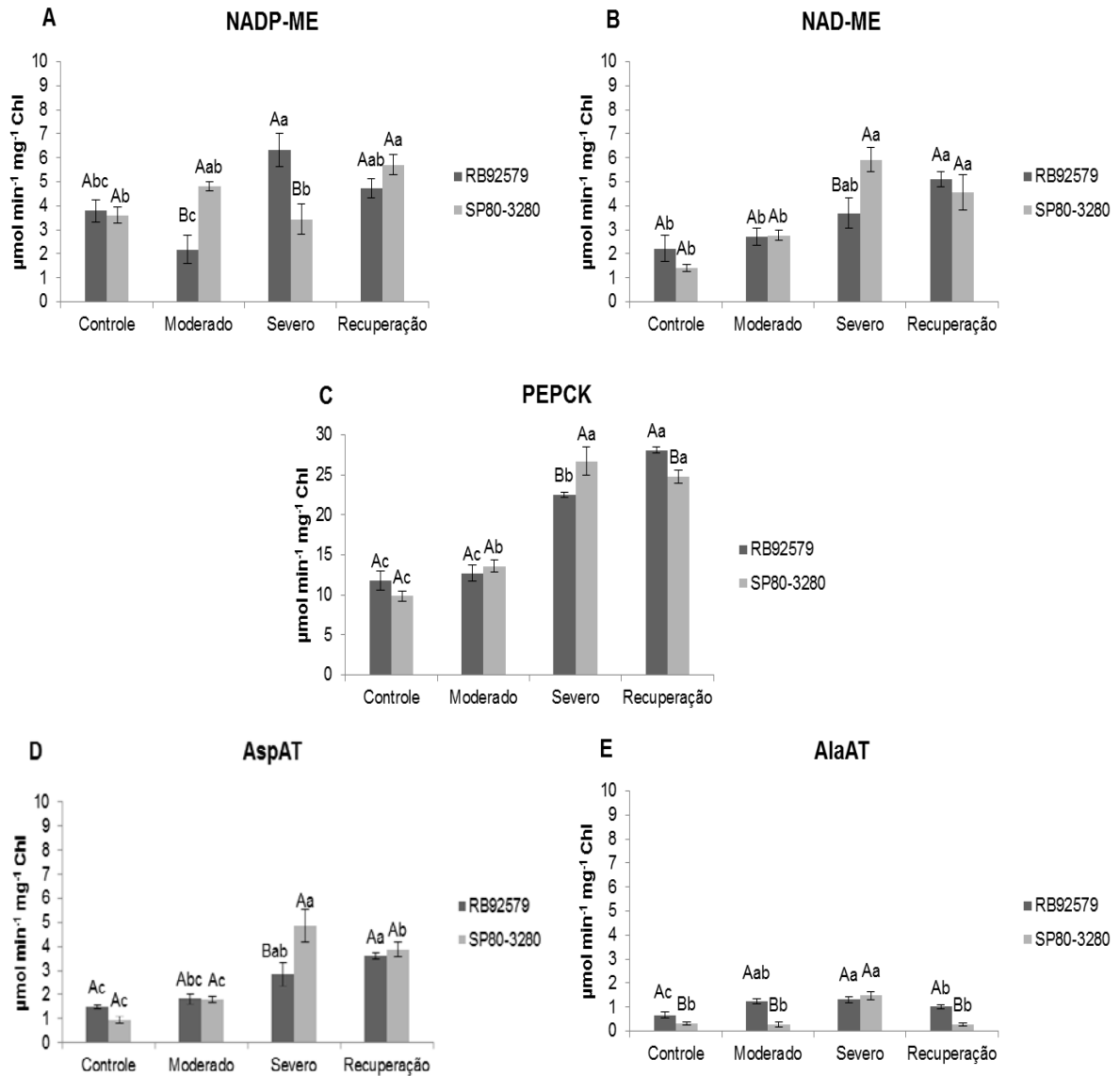
Apesar de um leve aumento, a atividade da enzima NAD-ME não diferiu significativamente entre os genótipos nos tratamentos controle e estresse moderado. O genótipo tolerante (RB92579) apresentou um aumento significativo na atividade desta enzima após a reidratação ( $5,11 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ ), enquanto que as plantas do genótipo suscetível ao déficit hídrico (SP80-3280) mostraram maior atividade sob estresse hídrico severo ( $5,92 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ ), mantendo esses valores 48 hrs após reidratadas (FIGURA 6B).

Entre as enzimas estudadas neste trabalho, comparativamente às condições normais de suprimento de água, a enzima PEPCK apresentou o maior aumento de atividade em plantas de ambos genótipos quando estes foram submetidos a condições de déficit hídrico. O genótipo suscetível (SP80-3280) apresentou um crescimento gradativo até o estresse severo, mantendo esses altos valores de atividade quando reidratado ( $24,78 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ ). O genótipo tolerante ao déficit hídrico (RB92579) também mostrou um aumento significativo na atividade da PEPCK em relação ao controle na condição mais severa de déficit hídrico (91%) e na recuperação (138%), tratamento este onde foi observada a maior atividade dessa enzima ( $28,09 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ ) (FIGURA 6C).

Em relação às aminotransferases, a atividade da enzima AspAT no genótipo RB92579 apresentou um pequeno aumento a cada nível de estresse

hídrico, sendo que sua maior atividade foi 48 hrs após a reidratação ( $3,61 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ ). No genótipo suscetível (SP80-3280) a atividade foi alta no estresse severo, sendo que neste tratamento a atividade dessa enzima foi maior nesse genótipo ( $4,86 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ ), e após a reidratação houve uma queda de 20% na atividade, que mesmo assim foi maior que nas plantas controle (FIGURA 6D). A atividade da enzima AlaAT foi maior no genótipo tolerante ao déficit hídrico (RB92579) em todos os tratamentos, com exceção do estresse severo quando a atividade desta enzima no genótipo suscetível atingiu o mesmo nível observado no tolerante ( $1,32 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ ). Quando reidratadas, a atividade da AlaAT no genótipo suscetível (SP80-3280) retornou aos níveis detectados nas plantas em condições normais de suprimento de água (redução de 81%), enquanto os do tolerante diminuíram, mas de modo menos drástico (23%) (FIGURA 6E).

FIGURA 6 – Atividade das enzimas NADP-ME, NAD-ME, PEPCK, AspAT e AlaAT em dois genótipos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes níveis de estresse hídrico.



Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os genótipos (RB92579 e SP80-3280) em cada tratamento e letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tratamentos (controle, moderado, severo e recuperação) para cada genótipo. Valores apresentados como média e expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ . Barra de erros indica o desvio padrão ( $n=3$ ). Teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

Fonte: Autor.

## 6 DISCUSSÃO

Baseado na proposta de Furbank (2011), plantas C4 do subtipo NADP-ME, como a cana-de-açúcar, podem exibir certo nível de flexibilidade na utilização dos subtipos de descarboxilação, e isso pode ocorrer dependendo de fatores ambientais. Para verificar a possibilidade destes mecanismos de descarboxilação serem controlados de modo diferencial dependendo de fatores ambientais, plantas de dois genótipos de cana-de-açúcar (RB92579, tolerante, e SP80-3280, suscetível ao déficit hídrico) foram submetidas a déficit hídrico. Após caracterização fisiológica, estes genótipos foram avaliados quanto à expressão de genes que codificam as enzimas envolvidas nos três diferentes subtipos bioquímicos C4 e quanto à atividade das enzimas que caracterizam estes subtipos em diferentes condições de suprimento de água.

### 6.1 Avaliações fisiológicas

A cana-de-açúcar, quando submetida à deficiência hídrica, apresenta várias alterações morfofisiológicas, como redução do potencial de água foliar, diminuição da condutância estomática, redução da transpiração e da fotossíntese, o que pode levar ao comprometimento das etapas fotoquímicas e bioquímicas desse processo (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005).

A redução da disponibilidade de água no solo diminui o potencial de água foliar ( $\psi_f$ ), determinando o grau de hidratação da planta (BERGONCI et al., 2000). O  $\psi_f$  pode ser considerado um bom indicador do estado hídrico da planta que maximiza a sua atividade fotossintética (ENDRES et al., 2010). Avaliando genótipos de cana-de-açúcar tolerantes e suscetíveis a deficiência hídrica, Pincelli (2010) mostrou que plantas tolerantes tiveram capacidade de manter seus valores de  $\psi_f$  maiores que as plantas suscetíveis sob o mesmo tratamento de deficiência hídrica. Resultado semelhante foi observado neste trabalho, no qual o genótipo tolerante (RB92579) apresentou menor redução no  $\psi_f$  quando submetido ao estresse severo por um período de doze dias (FIGURA 3). É interessante notar que este genótipo também obteve maior taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) comparativamente ao SP80-3280 em condições normais de suprimento de água (controle) (FIGURA 4A).

Avaliando diversas variedades RB de cana-de-açúcar em cultivo irrigado por gotejamento, Ferreira Júnior et al. (2012) observaram que a RB92579 obteve maior fotossíntese, além de elevado rendimento de colmos e de açúcar devido à sua maior capacidade de rebrota e eficiência em conversão de energia em fotoassimilados. Igualmente ao encontrado neste trabalho, avaliando características morfofisiológicas de cultivares de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica, foi constatado que esse genótipo apresentou maior assimilação de CO<sub>2</sub> no tratamento sem restrição hídrica (GERONIMO, 2014).

As plantas de ambos genótipos quando submetidas ao déficit hídrico apresentaram uma redução nas taxas de assimilação de CO<sub>2</sub> (*A*). A diminuição da fotossíntese em diferentes genótipos de cana-de-açúcar sob estresse hídrico também já foi relatada (ZHAO; GLAZ; COMSTOCK, 2013). Entretanto, foi observado que o déficit hídrico causou a redução nas trocas gasosas de dois genótipos de cana-de-açúcar em três fases fenológicas avaliadas (crescimento inicial, crescimento máximo e de acúmulo de sacarose no colmo) (MACHADO et al., 2009).

Ao contrário do observado no genótipo RB92579, quando as plantas foram reidratadas, o genótipo SP80-3280 (suscetível ao déficit hídrico) manteve baixos os valores de *A*. Como o tratamento de recuperação foi avaliado 48 hrs após a reidratação, isto pode ser um indicativo que este período não foi suficiente para que esse genótipo recuperasse a sua capacidade de assimilação de CO<sub>2</sub>. Esse mesmo comportamento foi observado em alguns genótipos de cana-de-açúcar submetidos ao déficit hídrico, nos quais houve um aumento mínimo na taxa fotossintética um dia após a reidratação (GRAÇA et al., 2010). O maior tempo de recuperação da fotossíntese das variedades após o fim do déficit hídrico significa menor capacidade da variedade em retornar seu estado de homeostase original (SOUZA; OLIVEIRA; MACHADO, 2004).

Em cana-de-açúcar sob estresse moderado a diminuição da fotossíntese ocorre devido à redução da condutância estomática (*G<sub>s</sub>*) (DU et al., 1998). A redução da *G<sub>s</sub>* no início do déficit hídrico ocasiona um efeito protetor, pois a planta evita a perda de água para a atmosfera através da transpiração e mantém seu estado hídrico em condições adequadas (CHAVES et al., 2007). Entretanto, o fechamento estomático reduz a difusão de CO<sub>2</sub> na folha, ocasionando queda na fotossíntese (CORNIC, 2000). Neste estudo, a *G<sub>s</sub>* foi reduzida com o déficit hídrico, mas não houve diferença significativa entre o estresse moderado e severo entre os



genótipos (FIGURA 4B). Esse comportamento em diferentes genótipos também foi verificado, na qual se constatou que apesar de ocorrer tendência de redução na  $G_s$  ao longo do estresse hídrico, não houve, de maneira geral, diferenças entre os genótipos de cana-de-açúcar avaliados (GONÇALVES et al., 2010).

Reduções mais pronunciadas na transpiração ( $E$ ) quando as plantas foram submetidas ao estresse hídrico severo, como observado neste estudo (FIGURA 4C), já foram descritas (GONÇALVES et al., 2010). Jaiphong et al. (2016) avaliando os efeitos da duração e combinação de condições de seca e inundação em cana-de-açúcar, também observaram uma redução drástica na transpiração quando as plantas foram expostas a condições de seca, e assim que foram reidratadas recuperaram a  $E$  ao nível das plantas irrigadas. A  $E$  é dependente de vários fatores, sendo eles, a condutância da camada limite da folha, a  $G_s$  e a diferença do vapor de pressão entre folha e ar, que por sua vez depende da temperatura da folha e da umidade relativa do ar. Já as taxas de  $A$  dependem tanto da  $G_s$  quanto da parte bioquímica (GHANNOUM, 2016).

## 6.2 Biomassa

O menor acúmulo de matéria seca pelas plantas sob déficit hídrico é consequência dos mecanismos da própria planta para evitar a perda excessiva de água. Nestas condições ocorre a diminuição da área foliar, da interceptação de radiação e da condutância estomática, levando a menor perda de água pela transpiração, mas também acarreta menor assimilação de  $CO_2$  e, dessa forma, menor acúmulo de biomassa (TAIZ; ZEIGER, 2013; CAVATTE, 2011). Plantas de cana-de-açúcar submetidas a condições de déficit hídrico diminuem significativamente a massa seca total, incluindo massa seca de folhas, de raízes e do colmo, além da área foliar, sendo que a maior diminuição relativa pode ocorrer na massa seca do colmo (BARBOSA et al., 2015). Estudos mostram que a restrição hídrica imposta durante a fase de alongamento do colmo em cana-de-açúcar, mesmo estágio de desenvolvimento em que foram coletados os dados neste trabalho, causa menores taxas de crescimento e conseqüente menor produção de biomassa (SANTOS et al., 2015).

Como esperado, o déficit hídrico afetou negativamente os parâmetros de biomassa nos dois genótipos de cana-de-açúcar utilizados neste estudo

(TABELA 2). A redução da biomassa está associada com as trocas gasosas foliares, principalmente com reduções na  $A$  e na  $G_s$ , que levam a um menor acúmulo de biomassa (ZHAO; GLAZ; COMSTOCK, 2013). Neste estudo, plantas sob deficiência hídrica reduziram a condutância estomática ( $G_s$ ), sendo que os outros parâmetros avaliados seguiram a mesma tendência, pois com a diminuição da abertura estomática ocorreu também uma queda na transpiração ( $E$ ) e na assimilação de  $CO_2$  ( $A$ ) (FIGURA 4).

O genótipo SP80-3280 apresentou maior área foliar e massa seca do colmo, o que levou a maior massa seca total nas plantas irrigadas, apesar da sua taxa fotossintética ser menor em relação ao genótipo mais tolerante ao déficit hídrico (RB92579), o que pode ser considerado um mecanismo de compensação das plantas. Esse fato foi também observado por Abreu et al. (2013), onde plantas de cana-de-açúcar que apresentaram maior área foliar resultaram em maior produtividade de colmos. Entretanto, SP80-3280 quando comparado ao genótipo tolerante, apresentou maiores reduções na biomassa. Genótipos mais sensíveis à seca são normalmente mais afetados em condições de estresses ambientais em virtude de reduzirem, principalmente, sua massa de folhas e área foliar (WAHID, 2004).

### 6.3 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Diante das evidências de que a regulação das enzimas associadas à fotossíntese C4 é afetada por estresses abióticos, como a restrição hídrica, uma forma de analisar parcialmente essa flexibilidade é através da análise do nível transcricional dos genes que codificam essas enzimas (MCCORMICK; CRAMER; WATT, 2008).

A expressão diferencial de genes relacionados à respostas a diferentes níveis de deficiência hídrica foi recentemente estudada em plantas de cana-de-açúcar em estágio de alongamento do colmo (LI et al., 2016). Estes autores observaram que os genes *PEPCK*, *AspAT*, *NADP-MDH* e *PPDK* foram pouco expressos sob déficit hídrico, enquanto que o *AlaAT* foi altamente induzido sob estresse, o que também ocorreu em nosso estudo. Entretanto, ao contrário do observado por Li et al. (2016), uma das isoformas que codifica a enzima aspartato aminotransferase (*AspAT1*) exibiu alta indução transcricional sob estresse severo.

Li et al. (2016) também observaram que o gene *PEPC* aumentou a sua expressão sob déficit hídrico severo (nove dias de suspensão de irrigação). Ao contrário, neste trabalho a abundância de transcritos deste gene foi relativamente reduzida sob condições de estresse comparativamente às plantas irrigadas em ambos genótipos, em concordância com o relatado por Rodrigues, Laia e Zingaretti (2009) em um estudo de expressão gênica usando dois genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para a tolerância ao déficit hídrico. Entretanto, as poucas diferenças observadas aqui em relação ao trabalho de análise transcricional por microarranjos relatado por Li et al. (2016), podem ser justificadas pela utilização de diferentes tratamentos de estresse, estádios de desenvolvimento dissimilares, diferentes genótipos ou pelos distintos métodos de análise aplicados entre os estudos (FIGURA 5).

O aumento na expressão dos genes *NADP-MDH*, *PPDK* e *NADP-ME* sob estresse hídrico severo no genótipo SP80-3280 (suscetível) pode ser explicado pelo fato de que nestas condições de estresse a condutância estomática é reduzida e a quantidade de CO<sub>2</sub> que entra nas células do mesofilo também diminui. Neste caso, como a entrada de CO<sub>2</sub> é menor, ocorre um aumento na expressão destes genes para suprir o CO<sub>2</sub> necessário para o ciclo de Calvin, onde a *NADP-MDH* produz malato que é descarboxilado nas células da bainha dos feixes vasculares pela *NADP-ME* liberando CO<sub>2</sub> necessário. Além disso, a *PPDK* vai regenerar o fosfoenolpiruvato (PEP) através do piruvato dando continuidade ao ciclo C4 (DOUBNEROVÁ; RYSLAVÁ, 2011).

Transcritos de genes associados à fotossíntese do subtipo NAD-ME foram observados em *Flaveria ramosissima*, que está próxima ao subtipo NADP-ME (GOWIK et al., 2011). A expressão preferencial de NAD-ME e NADP-ME pode não estar exclusivamente correlacionada com o seu subtipo correspondente. Esses perfis de transcrição podem indicar um ancestral comum, onde os subtipos NAD-ME e NADP-ME podem estar presentes em conjunto em algum nível (RAO; DIXON, 2016). Quando as plantas de cana-de-açúcar foram submetidas ao déficit hídrico houve um grande aumento na expressão de mRNA de uma das isoformas do gene que codifica a enzima málica dependente do NAD<sup>+</sup> (*NAD-ME2*) no genótipo suscetível (SP80-3280), principalmente sob estresse severo. Entretanto, apesar deste aumento do número de transcritos em relação ao controle irrigado, a expressão deste gene ainda é inferior ao observado para o *NADP-ME* em condições

normais de suprimento de água (controle). Neste caso, houve um acréscimo de seis ciclos de amplificação ( $C_q$  - quantification cycle) para a detecção do gene *NAD-ME2* em comparação ao gene *NADP-ME* no genótipo suscetível, assim como também no tolerante. Mesmo levando-se em consideração a diferença de eficiência dos iniciadores, estes dados mostram que o gene *NADP-ME* é mais expresso (cerca de 50 vezes) que o *NAD-ME2* em plantas de cana-de-açúcar sob as condições não estressantes utilizadas neste trabalho (ANEXO C).

Avaliando-se a expressão de mRNA do gene *PEPCK*, observa-se que os valores de  $C_q$  no tratamento irrigado nos dois genótipos são similares aos detectados para *NADP-ME* (ANEXO C). A elevada expressão do gene *PEPCK* foi também observada em células da bainha em folhas de milho, uma espécie classificada como NADP-ME (TAUSTA et al., 2014). Transcritos desse gene também foram verificados em folhas de cana-de-açúcar do genótipo SP80-3280, mesmo utilizado nesse trabalho, sendo que a maior expressão foi detectada na base das folhas (MATTIELLO et al., 2015).

O elevado número de transcritos dos genes *AspAT2* e *AlaAT* verificados neste estudo pode estar associado com a alta expressão de *PEPCK* aqui observada. Ao utilizar essa segunda descarboxilase, outras enzimas envolvidas nesta via são conseqüentemente mais necessárias para manter o mecanismo de descarboxilação funcionando de modo eficiente. Isto foi demonstrado em milho e *Setaria viridis*, espécies que pertencem ao subtipo NADP-ME, onde os genes *AspAT* e *AlaAT* são altamente expressos em células do mesófilo e da bainha dos feixes vasculares (CHANG et al., 2012; JOHN et al., 2014).

#### 6.4 Atividades enzimáticas

Para verificar se plantas NADP-ME poderiam utilizar *PEPCK* como via alternativa de descarboxilação em resposta a flutuações de fatores ambientais diversos (FURBANK, 2011), foram determinadas as atividades enzimáticas das enzimas que classificam os três subtipos bioquímicos da fotossíntese C4, além da *AspAT* e *AlaAT*, importantes enzimas da via *PEPCK*.

Têm sido relatado que em plantas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico, os processos bioquímicos do ciclo de Calvin e da via C4 não são afetados pelo estresse hídrico moderado, sendo que o declínio da fotossíntese é

causado pelo fechamento dos estômatos (DU et al., 1998). Por outro lado, estes autores mencionam que sob estresse severo, as atividades das enzimas da via C4 foram reduzidas significativamente. Neste estudo, as atividades das enzimas NADP-ME, NAD-ME, PEPCK, AspAT e AlaAT exibiram um aumento em ambos os genótipos sob estresse severo, com destaque para a enzima PEPCK (FIGURA 6). A alta atividade dessa enzima em espécies C4 pertencentes a diferentes subtipos vem sendo relatada (WALKER et al., 2002; CARMO-SILVA et al., 2008; PINTO et al., 2014). Essas descobertas desafiam a visão clássica de que apenas uma descarboxilase está presente nos subtipos das plantas C4 (PINTO et al., 2014). Há também um grande número de espécies onde a atividade dessa enzima é maior que as outras descarboxilases, o que sugere um fluxo entre a elevada atividade de PEPCK e a baixa de NAD-ME e NADP-ME, ou vice-versa (WASHBURN et al., 2015).

Baseada em diversos estudos, Ludwig (2016) afirma que espécies C4, além da atividade de uma enzima de descarboxilação que define seu subtipo bioquímico, considerada a descarboxilase primária, um aumento na atividade de outra descarboxilase também pode ocorrer. Em milho, espécie C4 que pertence ao mesmo subtipo bioquímico da cana-de-açúcar (NADP-ME), a enzima PEPCK vem sendo considerada como segunda descarboxilase (BELLASIO; GRIFFITHS, 2014). Nesta espécie, a PEPCK exibiu apenas um quarto da atividade de NADP-ME, porém foi suficientemente elevada para catalisar pelo menos um quinto das reações de descarboxilação. Os transcritos dos genes que codificam essas enzimas apresentaram um padrão diferente das atividades das enzimas. Assim, a atividade total foi provavelmente composta de múltiplas isoformas e/ou sujeitas à regulação pós-transcricional (PICK et al., 2011).

A elevada atividade de PEPCK em gramíneas que não pertencem a este subtipo bioquímico, *Paspalum dilatatum* (NADP-ME) e *Cynodon dactylon* (NAD-ME), já foi relatada e sugere que esta enzima pode atuar como descarboxilase suplementar para estes subtipos (CARMO-SILVA et al., 2008). No entanto, a presença de alta atividade da PEPCK precisa ser mais investigada e complementada com estudos para caracterizar e quantificar o tipo dessa enzima, pois ela também é conhecida por ter funções não-fotossintéticas em aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, lipídeos e metabolismo secundário (LEEGOOD; WALKER, 2003).

Embora a enzima PEPCK tenha apresentado elevada atividade com aumento do estresse hídrico (FIGURA 6C), a expressão do gene que codifica essa proteína não seguiu o mesmo padrão e reduziu o número de transcritos quando os dois genótipos foram submetidos à deficiência de água (FIGURA 5). A falta de relação entre as atividades enzimáticas e os níveis de transcrição dos genes pode ser resultado de diversos fatores, como a estabilidade dos transcritos, sistemas de regulação pós-transcricionais e pós-transducionais, disponibilidade de substrato e também devido ao envolvimento de outras isoformas em processos biológicos que ocorrem em diferentes níveis temporais e espaciais (CARVALHO et al., 2013). No caso específico da PEPCK, foi observado que esta enzima é fosforilada reversivelmente em vários tecidos em algumas plantas C4 (WALKER; LEEGOOD, 1995, 1996). Nas plantas nas quais a PEPCK é fosforilada, esta fosforilação é efetuada em folhas no escuro e desfosforiladas nas folhas sob iluminação (WALKER; LEEGOOD, 1996), o que mostra que a fosforilação modula a atividade dessa enzima. Portanto, o aumento da atividade da PEPCK aqui observada em plantas sob deficiência hídrica sugere que nestas condições sua regulação não se dá ao nível transcricional, mas sim pela modulação de sua atividade via desfosforilação. Trabalhos envolvendo a purificação desta enzima em cana-de-açúcar para a análise da modulação de sua atividade por fosforilação e a clonagem da sequência completa de cDNA para verificar sítios de fosforilação poderão ser importantes para caracterizar a regulação da PEPCK em cana-de-açúcar sob condições de deficiência hídrica.

Neste trabalho também foi observada uma expressiva atividade da enzima NAD-ME e em valores similares ao observado para a NADP-ME, principalmente nos tratamentos com déficit hídrico (FIGURA 6A, B). Possivelmente, essa enzima pode estar proporcionando o ATP necessário para o aumento da atividade da PEPCK para as plantas de cana-de-açúcar sob estresse (KANAI; EDWARDS, 1999). Análises por Western Blot mostram que espécies que utilizam a PEPCK apresentam níveis significativos de NAD-ME, sendo que o ATP necessário para que ocorra a reação de PEPCK pode ser proporcionado pela NAD-ME mitocondrial utilizando malato como substrato, além da respiração mitocondrial pelo ciclo dos ácidos tricarbóxicos, ou energia derivada da oxidação de alguma triose fosfato a 3-fosfoglicerato no citosol que podem ser fontes alternativas de ATP (VOZNESENSKAYA et al., 2006).

Os resultados aqui obtidos mostram um aumento na atividade das enzimas AspAT e AlaAT em ambos os genótipos quando submetidos ao estresse hídrico severo (FIGURA 6D, E). Em milho, espécie com o mesmo subtipo bioquímico de descarboxilação da cana-de-açúcar (NADP-ME), estas enzimas também apresentam elevada atividade (PICK et al., 2011). Nesta espécie, foi observado que as células da bainha dos feixes vasculares mostraram capacidade de descarboxilação de aspartato e que esse processo é aparentemente realizado por uma sequência de atividades enzimáticas iniciada por uma enzima AspAT, uma NADP-MDH citoplasmática que gera o malato, sendo este descarboxilado pela NADP-ME no cloroplasto. Também pode ocorrer a atividade de uma AlaAT mitocondrial para equilibrar o grupo amino entre as células do mesofilo e da bainha. Essa descarboxilação de aspartato pode representar cerca de 20% da descarboxilação máxima do malato, contribuindo com apenas uma porção do CO<sub>2</sub> total liberado em células da bainha (CHAPMAN; HATCH, 1981).

Em acordo com a proposta feita por Furbank (2011), quando ocorre um aumento na atividade de PEPCK, é necessário que também aumente NAD-ME para fornecer ATP para essa descarboxilase, AspAT para formar o oxaloacetato (OAA) que será descarboxilado e AlaAT para a produção de alanina através do piruvato que é enviada às células do mesofilo. Assim, como foi observado neste estudo, houve um aumento na atividade dessas enzimas quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico, e que vai de encontro ao sugerido por aquele autor para explicar a contribuição do aspartato para o *pool* de CO<sub>2</sub> nas espécies subtipo NADP-ME.

Como proposto por Furbank (2011), a utilização dessa outra via de descarboxilação pode ser modulada mediante a fatores ambientais diversos. Nossos dados mostram que através do aumento do nível de estresse hídrico também houve um incremento na atividade das enzimas importantes para as reações envolvidas na via PEPCK (PEPCK, NAD-ME, AspAT, AlaAT), sendo que o genótipo suscetível (SP80-3280) sempre exibiu atividades superiores comparativamente ao tolerante no estresse severo (FIGURA 6). Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que o genótipo suscetível atingiu níveis de estresses metabólicos maiores que o tolerante (RB92579) no estresse severo (FIGURA 3).

## 6.5 A cana-de-açúcar pertence ao subtipo NADP-ME clássico?

Atualmente, conforme relatado na literatura, existem pelo menos três variações da via C4 no sistema de descarboxilação em plantas, ou seja, os subtipos NADP-ME, NAD-ME ou PEPCK. O subtipo NADP-ME não envolve aspartato e utiliza essa enzima para liberar CO<sub>2</sub> a partir de malato. O subtipo NAD-ME envolve aspartato e utiliza a enzima málica dependente de NAD<sup>+</sup>, enquanto o subtipo PEPCK possui uma via suplementar para liberação de CO<sub>2</sub> por essa enzima (TAIZ; ZEIGER, 2013; FURBANK, 2011; MAIER; ZELL; MAURINO, 2011). Esses três subtipos da fotossíntese C4 são classificados primariamente de acordo com a enzima de descarboxilação com maior predominância (HATCH, 1987).

A literatura relata que a cana-de-açúcar é considerada uma espécie C4 subtipo NADP-ME (BOWYER; LEEGOOD, 1997). Apesar desse relato, não há nenhum estudo específico demonstrando que a cana-de-açúcar tem a atividade da enzima NADP-ME como predominante para a descarboxilação dos ácidos C4. Em oposição ao que é estabelecido atualmente, os dados obtidos neste trabalho mostram uma atividade da enzima PEPCK significativamente maior em relação às outras enzimas analisadas, mesmo em plantas que permaneceram em condições normais de suprimento de água. Além disso, foi observado um aumento na expressão gênica e na atividade das enzimas AspAT e AlaAT sob condições de déficit hídrico, enzimas essas que não caracterizam as vias metabólicas utilizadas no subtipo NADP-ME clássico, conforme descrito por Maier, Zell e Maurino (2011).

Pesquisas mais recentes indicam uma flexibilidade entre os três subtipos de fotossíntese C4, conforme mostrado pela ocorrência de vias C4 de descarboxilação mistas em várias plantas anteriormente consideradas como pertencentes exclusivamente a um único subtipo de mecanismo fotossintético C4 (WANG et al., 2014). Por exemplo, foi mostrado que plantas de milho podem usar tanto malato como aspartato para a geração de CO<sub>2</sub> (CHAPMAN; HATCH, 1981), demonstrando que as folhas de milho possuem atividade da AspAT visando sustentar um fluxo de CO<sub>2</sub> mais eficiente. Além disso, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), considerada a enzima identificadora desta via também é ativa no milho (PICK et al., 2011). Resultados semelhantes foram relatados em *Flaveria bidentis* (planta classificada como NADP-ME) que também utiliza tanto malato como aspartato e demonstrou atividade da AspAT (MEISTER; AGOSTINO;



HATCH, 1996). Em *Zea mays*, *Sorghum bicolor* e *Echinochloa frumentacea*, espécies NADP-ME, através de análise por Western Blot, foi encontrada a presença da enzima PEPCCK, com maiores níveis em *Zea mays* (VOZNESENSKAYA et al., 2006).

Em uma descrição histórica no qual são relatadas as observações feitas antes da elucidação da via bioquímica da fotossíntese C<sub>4</sub>, como também as principais descobertas que moldaram a compreensão desse mecanismo (FURBANK, 2016), foi observado que nos trabalhos iniciais com cana-de-açúcar os primeiros compostos estáveis formados na fotossíntese desta espécie foram malato e aspartato (KORTSCHAK; HARTT; BURR, 1965). Assim, a proposta da via fotossintética para fixação de carbono em cana-de-açúcar elucidada em 1966 envolveu a formação de malato e aspartato, onde a maior porcentagem do C<sup>14</sup> incorporado foi detectada nesses dois ácidos (HATCH; SLACK, 1966).

Em concordância com o papel destas enzimas em cana-de-açúcar, estudo de transcriptoma com esta espécie utilizando a técnica SAGE, não foram encontrados transcritos de *NADP-MDH* e *AlaAT*, enquanto que uma alta expressão dos genes *PEPCCK* e *AspAT* foi observada (CALSA JÚNIOR; FIGUEIRA, 2007). O ciclo *NADP-ME* requer malato produzido por *NADP-MDH* nas células do mesofilo, o qual é transportado para as células da bainha dos feixes vasculares, enquanto o ciclo *PEPCCK* depende do aspartato produzido por *AspAT*. Portanto, a falta ou a extremamente baixa transcrição de *NADP-MDH* em comparação com a elevada observada para *PEPCCK* e *AspAT*, sugerem que a via de descarboxilação por *PEPCCK* parece predominar sobre *NADP-ME* em folhas de cana-de-açúcar, tanto em condições irrigadas como sob déficit hídrico.

Estes dados permitem questionar se a cana-de-açúcar pode ser classificada como uma espécie NADP-ME clássica. Apesar da superior atividade da PEPCCK, nossos dados também não permitem afirmar que a cana-de-açúcar deva ser classificada como uma espécie PEPCCK clássica. Por exemplo, quando analisados os valores de  $C_q$  para a expressão dos genes *NADP-ME* e *PEPCCK* verifica-se que *NADP-ME* apresenta maior expressão, com início de amplificação por volta do ciclo 28 enquanto a *PEPCCK* somente foi detectada no ciclo 32. Os  $C_q$  dos genes *AspAT* e *AlaAT* também não foram altos (início de amplificação entre os ciclos 30 e 33) em comparação aos das outras enzimas analisadas neste trabalho (ANEXO C). Além disso, as atividades destas duas aminotransferases foram relativamente

baixas para espécies classificadas como PEPCK clássicas (HATCH; KAGAWA; CRAIG, 1975).

Em adição a esta dificuldade em classificar a cana-de-açúcar em subtipos C4 somente pela predominância da atividade enzimática correspondente, é notório o fato de que, até o momento, esta é a única espécie denominada como NADP-ME clássica na qual foi observada a presença de mestoma (ROBINSON-BEERS; EVERT, 1991a; 1991b). Plantas do subtipo NADP-ME não possuem mestoma, que é uma camada de células não-fotossintéticas suberizadas localizadas entre as células da bainha e os feixes vasculares. Nos subtipos NAD-ME e PEPCK existe a presença de mestoma e em ambos ocorre suberização dessa camada de células, porém apenas nas plantas PEPCK a bainha é suberizada (MERTZ; BRUTNELL, 2014; RAO; DIXON, 2016). A cana-de-açúcar é a única exceção, pois apesar de ser considerada NADP-ME, foi relatada a presença de mestoma ao redor dos seus feixes vasculares, e em alguns grandes feixes, pode haver mais de uma camada dessas células (ROBINSON-BEERS; EVERT, 1991a; 1991b; ELAHI; ASHRAF, 2001; JOARDER et al., 2010). Além disso, quando vistas sob microscópio eletrônico, as paredes de todas as células de mestoma da cana-de-açúcar, incluindo aquelas dos pequenos feixes, exibem lamelas de suberina, característica essa observada no subtipo PEPCK (ROBINSON-BEERS; EVERT, 1991a; 1991b).

Wang et al. (2014) afirmam que a classificação atual dos três subtipos bioquímicos da fotossíntese C4 deve ser revista, sendo que apenas NADP-ME e NAD-ME devem ser considerados como subtipos distintos, com a via PEPCK atuando como um suplemento a estes dois tipos principais. Esses autores mostraram o mecanismo fisiológico para que aconteça a utilização dessa via suplementar, sendo que quando isso ocorre, além do malato e do piruvato, aspartato, PEP e alanina também são utilizados como ácidos de transferência entre as células do mesofilo e as da bainha dos feixes vasculares.

A variação na via C4 pode potencialmente permitir a manutenção de maior eficiência fotossintética sob condições ambientais diversas, como as aplicadas neste estudo. Esta via C4 mista, quando comparada com o subtipo NADP-ME, possui mecanismos adicionais para manter o balanço energético. Alterando a proporção de ácidos C4 transferidos, modula o equilíbrio de NADPH e ATP entre as células do mesofilo e da bainha (WANG et al., 2014). Diante desse contexto fisiológico, estes autores afirmam existir fatores que limitam a existência de plantas

C4 que utilizem apenas a PEPCK como descarboxilase. Neste caso, PEPCK libera  $\text{CO}_2$  e necessita de ATP nas células da bainha. Assim, um subtipo bioquímico apenas de PEPCK prefere mais energia alocada nesse compartimento, e isso é praticamente impossível de realizar, devido à estrutura da anatomia Kranz, onde as células da bainha estão rodeadas pelas células do mesofilo, onde a energia alocada é maior. Além disso, o aspartato é o ácido C4 transportado para as células da bainha e o PEP retorna para as células do mesofilo, causando um desequilíbrio no grupo amino.

Entretanto, os resultados aqui obtidos, conjuntamente com as informações já existentes na literatura, não apoiam a hipótese que a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) seja considerada como pertencente ao subtipo C4 NADP-ME clássico como acontece atualmente, mas sim considerá-la uma espécie NADP-ME + PEPCK, como proposto para outra importante espécie da tribo Andropogoneae, o milho (*Zea mays*) (RAO; DIXON, 2016).

## 7 CONCLUSÕES

Confirmando o observado em condições de campo e relatado em publicações de divulgação científica, as avaliações fisiológicas mostraram que o genótipo suscetível (SP80-3280) sofreu um estresse metabólico maior comparativamente ao genótipo descrito como tolerante (RB92579) quando submetido a condições de déficit hídrico severo e apresentou menor poder de recuperação fotossintética após a reidratação.

O estresse hídrico causou reduções na produção de biomassa de ambos os genótipos, com reduções mais pronunciadas no genótipo suscetível (SP80-3280) com um decréscimo de 42% da massa seca total ao final do período de estresse.

As análises transcricionais e atividades enzimáticas da via fotossintética C4 mostraram que a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) utiliza a via PEPCK como mecanismo de descarboxilação, além da NADP-ME. Em condições de déficit hídrico ocorre um aumento ainda maior na utilização da via PEPCK, tanto no genótipo tolerante quanto no suscetível ao déficit hídrico. Isto mostra que a utilização suplementar desta via de descarboxilação desempenha um papel importante na resposta e adaptação da cana-de-açúcar às condições de seca.

Atualmente a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é classificada como uma espécie do subtipo C4 NADP-ME clássico. Entretanto, os dados aqui obtidos, em conjunto com informações existentes na literatura, mostram que esta espécie não pode ser classificada como pertencente ao subtipo C4 NADP-ME clássico. Em razão da alta expressão e atividade da PEPCK e da flexibilidade na utilização dos mecanismos de fixação de carbono, a cana-de-açúcar deve assim ser denominada como uma espécie NADP-ME + PEPCK como já proposto para o milho.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. L. et al. Crescimento e produtividade de cana-de-açúcar em função da disponibilidade hídrica dos Tabuleiros Costeiros de Alagoas. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 3, p. 262-270, 2013.
- AGEITEC. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Cultivares de cana-de-açúcar**. 2005. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 08 jul. 2016.
- ANJUM, S. A. et al. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, Victoria Island, v. 6, n. 9, p. 2026-2032, may 2011.
- ARALDI, R. et al. Florescimento em cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 694-702, mar. 2010.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 1-15, jan. 1949.
- ARRUDA, P. Sugarcane transcriptome: A landmark in plant genomics in the tropics. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 24, n. 1-4, p. 1-2, jan./dec. 2001.
- AZEVEDO, R. A. et al. Sugarcane under pressure: An overview of biochemical and physiological studies of abiotic stress. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, n. 1, p. 42-51, mar. 2011.
- BAILLY, C. et al. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 357, p. 701-708, may/sep. 2000.
- BARBOSA, A. M. et al. Biomass and bioenergy partitioning of sugarcane plants under water deficit. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 37, n. 142, p. 1-8, aug. 2015.
- BELLASIO, C.; GRIFFITHS, H. The operation of two decarboxylases (NADP-ME and PEPCK), transamination and partitioning of C<sub>4</sub> metabolic processes between mesophyll and bundle sheath cells allows light capture to be balanced for the maize C<sub>4</sub> pathway. **Plant Physiology**, Rockville, v. 164, n. 1, p. 466-480, jan. 2014.
- BERGONCI, J. I. et al. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 8, p. 1531-1540, ago. 2000.
- BLUM, T.; BRIESEMEISTER, S.; KOHLBACHER, O. MultiLoc2: integrating phylogeny and Gene Ontology terms improves subcellular protein localization prediction. **BMC Bioinformatics**, London, v. 10, n. 274, p. 1-11, sep. 2009.

BOWYER, J. R.; LEEGOOD, R. C. Photosynthesis. In: DEY, P. M.; HARBONE, J. B. (Eds.). **Plant Biochemistry**, San Diego, p. 49-110, 1997.

BRÄUTIGAM, A. et al. Towards an integrative model of C4 photosynthetic subtypes: insights from comparative transcriptome analysis of NAD-ME, NADP-ME, and PEP-CK C4 species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 13, p. 3579-3593, mar. 2014.

CALSA JÚNIOR, T.; FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C4 metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v. 63, n. 6, p. 745-762, jan. 2007.

CARMO-SILVA, A. E. et al. The activities of PEP carboxylase and the C4 acid decarboxylases are little changed by drought stress in three C4 grasses of different subtypes. **Photosynthesis Research**, Amsterdam, v. 97, p. 223-233, jan./jul. 2008.

CARVALHO, K. et al. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo. **Molecular Biology Reports**, Heidelberg, v. 40, n. 4, p. 3269-3279, apr. 2013.

CASTRO, P. R. C.; SOUZA, M. R. C. Tópicos de fisiologia: Estresse. **STAB**, Piracicaba, v. 33, n. 4, p. 24-25, mar./abr. 2015.

CASU, R. E. et al. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by *in silico* analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. **Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v. 54, n. 4, p. 503-517, feb. 2004.

CAVATTE, P. C. A fisiologia dos estresses abióticos. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Eds.). *Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos*. Visconde do Rio Branco: Suprema, p. 39-79, 2011.

CHANG, Y. M. et al. Characterizing regulatory and functional differentiation between maize mesophyll and bundle sheath cells by transcriptomic analysis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 160, n. 1, p. 165-177, jul. 2012.

CHAPMAN, K. S. R.; HATCH, M. D. Aspartate decarboxylation in bundle sheath cells of *Zea mays* and its possible contribution to C4 photosynthesis. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 8, p. 237-248, 1981.

CHAVES, M. M. et al. Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 150, n. 2, p. 237-252, apr. 2007.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 551-560, 2009.

CHRISTIN, P. et al. Parallel recruitment of multiple genes into C4 photosynthesis. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 5, n. 11, p. 2174-2187, 2013.

CHRISTIN, P. et al. Genetic enablers underlying the clustered evolutionary origins of C4 photosynthesis in angiosperms. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 846-858, jan. 2015.

CIB. Conselho de Informações sobre Biotecnologia. **Guia da cana-de-açúcar: Avanço científico beneficia o País**. 20 p., set. 2009.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira – cana-de-açúcar**, v. 3 - Safra 2016/17, n. 1 - Primeiro levantamento, Brasília, p. 1-66, abril 2016.

CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 187-188, may 2000.

CZECHOWSKI, T. et al. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, p. 5-17, sep. 2005.

DOUBNEROVÁ, V.; RYSLAVÁ, H. What can enzymes of C4 photosynthesis do for C3 plants under stress? **Plant Science**, Amsterdam, v. 180, n. 4, p. 575-583, apr. 2011.

DU, Y. C. et al. Responses to water stress of enzyme activities and metabolite levels in relation to sucrose and starch synthesis, the Calvin cycle and the C<sub>4</sub> pathway in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 25, n. 2, p. 253-260, jan. 1998.

ELAHI, N. N.; ASHRAF, M. Study of various sized leaf vascular bundles and surrounding tissues of six sugarcane varieties. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Lahore, v. 4, n. 9, p. 1078-1082, 2001.

EMANUELSSON, M. et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 300, n. 4, p. 1005-1016, jul. 2000.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa Produção de informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 103 p., 2008.

ENDRES, L. et al. Photosynthesis and water relations in brazilian sugarcane. **The Open Agriculture Journal**, Bussum, v. 4, p. 31-37, jan. 2010.

FERNANDES, A. C. Cálculos na agroindústria canavieira. **STAB**, Piracicaba, 240 p., 2003.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** - Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras, MG: UFLA, 2010.

FERREIRA JÚNIOR, R. A. et al. Crescimento e fotossíntese de cana-de-açúcar em função de variáveis biométricas e meteorológicas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 11, p. 1229-1236, nov. 2012.

FURBANK, R. T. Evolution of the C<sub>4</sub> photosynthetic mechanism: are there really three C<sub>4</sub> acid decarboxylation types? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3103-3108, apr. 2011.

FURBANK, R. T.; HATCH, M. D. Mechanism of C<sub>4</sub> photosynthesis: the size and composition of the inorganic carbon pool in bundle-sheath cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 4, p. 958-964, dec. 1987.

FURBANK, R. T. Walking the C<sub>4</sub> pathway: past, present, and future. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 67, n. 14, p. 4057-4066, apr. 2016.

FURUMOTO, T.; HATA, S.; IZUI, K. Isolation and characterization of cDNAs for differentially accumulated transcripts between mesophyll cells and bundle sheath strands of maize leaves. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 41, n. 11, p. 1200-1209, nov. 2000.

GACHON, C.; MINGAN, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, jun. 2004.

GERONIMO, G. Z. **Características morfofisiológicas e agrupamento genético de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica**. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

GHANNOUM, O. How can we breed for more water use-efficient sugarcane? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 67, n. 3, p. 557-559, 2016.

GHANNOUM, O.; VON CAEMMERER, S.; CONROY, J. P. Carbon and water economy of Australian NAD-ME and NADP-ME C<sub>4</sub> grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, n. 3, p. 213-223, 2001.

GIBON, Y. et al. A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes in enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 12, p. 3304-3325, dec. 2004.

GONÇALVES, E. R. et al. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 4, p. 378-386, 2010.



- GOOD, A. G.; MUENCH, D. G. Purification and characterization of an aerobically induced alanine aminotransferase from barley roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 4, p. 1520-1525, aug. 1992.
- GOWIK, U. et al. Evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria*: how many and which genes does it take to make C<sub>4</sub>? **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 6, p. 2087-2105, jun. 2011.
- GRAÇA, J. P. et al. Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. **Brazilian Society of Plant Physiological**, Campos dos Goytacazes, v. 22, n. 3, p. 189-197, jul./sep. 2010.
- GUO, J. et al. The choice of reference genes for assessing gene expression in sugarcane under salinity and drought stresses. **Scientific Reports**, London, v. 4, p. 1-10, nov. 2014.
- HATCH, M. D. C<sub>4</sub>-pathway of photosynthesis. Evidence for an intermediate pool of carbon dioxide and identity of donor C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid. **The Biochemistry Journal**, Washington, v. 125, n. 2, p. 425-432, nov. 1971.
- HATCH, M. D. C<sub>4</sub> photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 895, n. 2, p. 81-106, 1987.
- HATCH, M. D.; KAGAWA, T.; CRAIG, S. Subdivision of C<sub>4</sub>-pathway species based on differing C<sub>4</sub> acid decarboxylating systems and ultrastructural features. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 2, n. 2, p. 111-128, 1975.
- HATCH, M. D.; SLACK, C. R. Photosynthesis by sugar-cane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. **Biochemical Journal**, London, v. 101, n. 1, p. 103-111, oct. 1966.
- IDEA NEWS. **Características agrônomicas da cultivar SP80-3280**. Ano 5, n. 41, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.ideaonline.com.br>>. Acesso em: 08 jul. 2016.
- INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, n. 2-3, p.185-202, jun. 2005.
- ISKANDAR, H. M. et al. Identification of drought-response genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 12, p. 1-14, jan. 2011.
- JADOSKI, C. J. et al. Fisiologia do desenvolvimento do estágio vegetativo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 3, n. 2, p. 169-176, mai./ago. 2010.
- JAIPHONG, T. et al. Effects of duration and combination of drought and flood conditions on leaf photosynthesis, growth and sugar content in sugarcane. **Plant Production Science**, Tokyo, v. 19, n. 3, p. 427-437, mar. 2016.

JOARDER, N. et al. Leaf blade and midrib anatomy of two sugarcane cultivars of Bangladesh. **Journal of Biological Sciences**, Bangladesh, v. 18, p. 66-73, 2010.

JOHN, C. R. et al. Evolutionary convergence of cell-specific gene expression in independent lineages of C<sub>4</sub> grasses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 165, n. 1, p. 62-75, may 2014.

KANAI, R.; EDWARDS, G. E. **The biochemistry of C<sub>4</sub> photosynthesis**. New York: Elsevier Academic Press, p. 49-87, 1999.

KIRKHAM, M. B. **Principles of soil and plant water relations**. New York: Elsevier Academic Press, 500 p., 2005.

KORTSCHAK, H. P.; HARTT, C. E.; BURR, G. O. Carbon dioxide fixation in sugarcane leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 40, n. 2, p. 209-213, mar. 1965.

LEEGOOD, R. C.; WALKER, R. P. Regulation and roles of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v. 414, n. 2, p. 204-210, jun. 2003.

LIBAULT, M. et al. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. **The Plant Genome**, Madison, v. 1, n. 1, p. 44-54, jul. 2008.

LI, C. et al. Differential expression profiles and pathways of genes in sugarcane leaf at elongation stage in response to drought stress. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 1-11, may 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods**, Amsterdam, v. 25, n. 4, p. 402-408, dec. 2001.

LONG, S. P. et al. Can improvement in photosynthesis increase crop yields? **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 315-330, mar. 2006.

LUDWIG, M. The roles of organic acids in C<sub>4</sub> photosynthesis. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 1-11, may. 2016.

MACHADO, R. S. et al. Respostas biométricas e fisiológicas ao déficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1575-1582, dez. 2009.

MAIER, A.; ZELL, M. B.; MAURINO, V. G. Malate decarboxylases: evolution and roles of NAD(P)-ME isoforms in species performing C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub> photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3061-3069, mar. 2011.

MATTIELLO, L. et al. Physiological and transcriptional analyses of developmental stages along sugarcane leaf. **BMC Plant Biology**, London, v. 15, p. 1-21, dec. 2015.

- MCCORMICK, A. J.; CRAMER, M. D.; WATT, D. A. Changes in photosynthetic rates and gene expression of leaves during a source–sink perturbation in sugarcane. **Annals of Botany**, Oxford, v. 101, n. 1, p. 89-102, jan. 2008.
- MEISTER, M.; AGOSTINO, A.; HATCH, M. D. The roles of malate and aspartate in C<sub>4</sub> photosynthetic metabolism of *Flaveria bidentis* (L.). **Planta**, Heidelberg, v. 199, n. 2, p. 262-269, jun. 1996.
- MERTZ, R. A.; BRUTNELL, T. P. Bundle sheath suberization in grass leaves: multiple barriers to characterization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 13, p. 3371-3380, mar. 2014.
- MOLINARI, H. B. C. et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 130; n. 2, p. 218-229, feb. 2007.
- MORAIS, L. K. de. et al. **Melhoramento genético de cana-de-açúcar**. Documentos 200, Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 38 p., dez. 2015.
- NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, n. 1, p. 88-95, jan. 2009.
- NASTARI, P. M. A importância do setor sucroenergético no Brasil. **Agroanalysis**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 16-17, mar. 2012.
- NISHIYAMA JÚNIOR, M. Y. et al. Full-length enriched cDNA libraries and ORFeome analysis of sugarcane hybrid and ancestor genotypes. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. 1-14, sep. 2014.
- PARRY, M. A. J. et al. Raising yield potential of wheat. II. Increasing photosynthetic capacity and efficiency. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 2, p. 453-467, jan. 2011.
- PETERHANSEL, C. Best practice procedures for the establishment of a C<sub>4</sub> cycle in transgenic C<sub>3</sub> plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3011-3019, feb. 2011.
- PICK, T. R. et al. Systems analysis of a maize leaf developmental gradient redefines the current C<sub>4</sub> model and provides candidates for regulation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 12, p. 4208-4220, dec. 2011.
- PINCELLI, R. P. **Tolerância à deficiência hídrica em cultivares de cana-de-açúcar avaliada por meio de variáveis morfofisiológicas**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- PINTO, H. et al. Photosynthesis of C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>–C<sub>4</sub>, and C<sub>4</sub> grasses at glacial CO<sub>2</sub>. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 13, p. 3669-3681, jul. 2014.

PIOVESAN, P.; SANTOS, F. dos. **Aspectos relacionados à cultura da Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*)**. Júlio de Castilhos, 6 de Dezembro de 2010. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABfdUAL/cana-acucar-saccharum-spp#>>. Acesso em: 30 jul. 2015.

RAINES, C. A. Increasing photosynthetic carbon assimilation in C<sub>3</sub> plants to improve crop yield: current and future strategies. **Plant Physiology**, Rockville, v. 155, n. 1, p. 36-42, jan. 2011.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 339, n. 1, p. 62-66, mar. 2003.

RAO, X.; DIXON, R. A. The differences between NAD-ME and NADP-ME subtypes of C<sub>4</sub> photosynthesis: More than decarboxylating enzymes. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 1-9, oct. 2016.

RICHARDS, R. A. Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 447-458, feb. 2000.

RIDESA. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Curitiba, 2010. 136 p.

ROBINSON-BEERS, K.; EVERT, R. F. Fine structure of plasmodesmata in mature leaves of sugarcane. **Planta**, Heidelberg, v. 184, n. 3, p. 307-318, jun. 1991a.

ROBINSON-BEERS, K.; EVERT, R. F. Ultrastructure of and plasmodesmatal frequency in mature leaves of sugarcane. **Planta**, Heidelberg, v. 184, n. 3, p. 291-306, jun. 1991b.

ROCHA, F. R. et al. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, London, v. 8, p. 1-22, mar. 2007.

RODRIGUES, F. A.; LAIA, M. L.; ZINGARETTI, S. M. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 176, n. 2, p. 286-302, feb. 2009.

SAGE, R. F. The evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. **New Phytologist**, London, v. 161, n. 2, p. 341-370, feb. 2004.

SANGUINO, A. et al. Controle do raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 2, p. 97 (resumo), jul. 1988.

SANGUINO, A. et al. **Controle do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar em toletes de três gemas pelo tratamento térmico em água a 52° C por 30 minutos**. (Relatório CTC – Centro de Tecnologia Canavieira), 1996.

SANTOS, A. B. et al. Water stress alters lignin content and related gene expression in two sugarcane genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 19, p. 4708-4720, may 2015.

SASSENATHCOLE, G. F.; PEARCY, R. W. Regulation of photosynthetic induction state by the magnitude and duration of low light exposure. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 4, p. 1115-1123, aug. 1994.

SETTA, N. et al. Building the sugarcane genome for biotechnology and identifying evolutionary trends. **BMC Genomics**, London, v. 15, p. 1-17, jun. 2014.

SHARWOOD, R. E.; SONAWANE, B. V.; GHANNOUM, O. Photosynthetic flexibility in maize exposed to salinity and shade. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 13, p. 3715-3724, mar. 2014.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 221-227, 2007.

SILVA, J. P. N.; SILVA, M. R. N. **Noções da cultura da cana-de-açúcar**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012, 105 p.

SILVA, M. A. et al. Pigmentos fotossintéticos e índice spad como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 173-181, jan./fev. 2014.

SINDAÇÚCAR. Sindicato da Indústria de Açúcar. Duas novas variedades de cana RB serão lançadas em Alagoas. **Informativo do Sindaçúcar**, Maceió, abr. 2016.

SOUZA, A. P. et al. Elevated CO<sub>2</sub> increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 1116-1127, aug. 2008.

SOUZA, G. M.; OLIVEIRA, R. F.; MACHADO, E. C. Temporal dynamics of stomatal conductance of plants under water deficit: Can homeostasis be improved by more complex dynamics? **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 3, p. 423-431, jul. 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 954 p., 2013.

TAUSTA, S. L. et al. Developmental dynamics of Kranz cell transcriptional specificity in maize leaf reveals early onset of C4-related processes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 13, p. 3543-3555, jul. 2014.

TRUJILLO, L. E. et al. SodERF3, a novel sugarcane (*Saccharum officinarum*) ethylene responsive factor (ERF), enhances salt and drought tolerance when overexpressed in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 512-525, apr. 2008.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. 71-74, jul. 2007.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p. 1-12, jun. 2002.

VERISSIMO, M. A. A. **Desempenho agrônômico de genótipos de cana-de-açúcar no Estado do Rio Grande do Sul**. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

VON CAEMMERER, S.; FURBANK, R. T. The C4 pathway: an efficient CO<sub>2</sub> pump. **Photosynthesis Research**, Amsterdam, v. 77, n. 191, p. 191-207, aug. 2003.

VOZNESENSKAYA, E. V. et al. Functional characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase-type C4 leaf anatomy: Immuno-, cytochemical and ultrastructural analyses. **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, n. 1, p. 77-91, jul. 2006.

WAHID, A. Analysis of toxic and osmotic effects of sodium chloride on leaf growth and economic yield of sugarcane. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 45, p. 133-141, 2004.

WALKER, R. P. et al. Effects of phosphorylation on phosphoenolpyruvate carboxykinase from the C4 plant guinea grass. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, n. 1, p. 165-172, jan. 2002.

WALKER, R. P.; LEEGOOD, R. C. Purification, and phosphorylation in vivo and in vitro, of phosphoenolpyruvate carboxykinase from cucumber cotyledons. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 362, n. 1, p. 70-74, mar. 1995.

WALKER, R. P.; LEEGOOD, R. C. Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants: studies in plants with C4 photosynthesis and Crassulacean acid metabolism and in germinating seeds. **Biochemical Journal**, London, v. 317, p. 653-658, aug. 1996.

WANG, J. et al. Microcollinearity between autopolyploid sugarcane and diploid sorghum genomes. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 261, p. 1-17, apr. 2010.

WANG, Y. et al. Three distinct biochemical subtypes of C4 photosynthesis? A modelling analysis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 13, p. 3567-3578, mar. 2014.

WASHBURN, J. D. et al. Phylogeny and photosynthesis of the grass tribe Paniceae. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 102, n. 9, p. 1493-1505, sep. 2015.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, Davis, v. 39, n. 1, p. 75-85, jul. 2005.


XIONG, L.; ZHU, J. K. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 112, n. 2, p. 152-166, jun. 2001.

YAGI, T. et al. Glutamate-aspartate transaminase from microorganisms. **Methods in Enzymology**, Amsterdam, v. 113, p. 83-89, 1985.

ZHAO, D.; GLAZ, B.; COMSTOCK, J. C. Sugarcane leaf photosynthesis and growth characters during development of water-deficit stress. **Crop Science**, Madison, v. 53, n. 3, p. 1066-1075, may 2013.

## ANEXOS

## ANEXO A – Análise química do solo utilizado no experimento.

<b>CURSO DE AGRONOMIA - Laboratório de Análise de Solos e Tecido Vegetal</b>	
Faculdade de Ciências Agrárias da Unoeste - Rodovia Raposo Tavares, Km 572 - Bairro Limoeiro. CEP 19067 - 175 - Presidente Prudente - São Paulo - Fone (18) 3229-2039 / 3229-2073	
27/03/2015	<b>RESULTADO DE ANÁLISE QUÍMICA DE SOLO</b>
Página 1 de 2	
SOLICITANTE : PEDRO PAULO CALDIM	
PROPRIEDADE : UNOESTE	
PROPRIETÁRIO : PEDRO PAULO CALDIM / CARLOS SÉRGIO TIRITAN	
MUNICÍPIO : PRESIDENTE PRUDENTE - SP	
	
ENTRADA 24/03/2015	
SAÍDA 27/03/2015	

## BÁSICA

Amostras Código	pH (CaCl <sub>2</sub> )	M.O. (g dm <sup>-3</sup> )	C total (g dm <sup>-3</sup> )	P (mg dm <sup>-3</sup> )	S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg dm <sup>-3</sup> )	Al <sup>3+</sup>	H + Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	m	V
0395	5,5	17,8	****	39,8	2,5	0	14,3	3,2	29,4	18,9	51,4	65,7	0	78,3

  
 Responsável Técnico  
 Carlos Henrique dos Santos  
 Engenheiro Agrônomo  
 CREA/SP 5060867863

Classe de Teores	P (resina)				K	Ca	Mg	Sat. Bases (V)	pH (CaCl <sub>2</sub> )	S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ))	Al (KCl)
	Anuais	Hortaliças	Perenes	Florestais							
	(mg dm <sup>-3</sup> )				(mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )		%	-	(mg dm <sup>-3</sup> )	(mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	
Muito Baixo	0 - 6	0 - 10	0 - 5	0 - 2	0 - 0,7	-	-	0 - 25	Até 4,3	-	-
Baixo	7 - 15	11 - 25	6 - 12	3 - 5	0,8 - 1,5	0 - 3	0 - 4	26 - 50	4,4 - 5,0	0 - 4	< 5
Médio	16 - 40	26 - 60	13 - 30	6 - 8	1,6 - 3,0	4 - 7	5 - 8	51 - 70	5,1 - 5,5	5 - 10	-
Alto	41 - 80	61 - 120	31 - 60	9 - 16	3,1 - 6,0	> 7	> 8	71 - 90	5,6 - 6,0	> 10	> 5
Muito Alto	> 80	> 120	> 60	> 16	> 6,0	-	-	> 90	> 6,0	-	-

Met. de Análise : Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais. Rajj et al. (2001). Instituto Agronômico de Campinas (IAC). 285 p.



**CURSO DE AGRONOMIA - Laboratório de Análise de Solos e Tecido Vegetal**

Faculdade de Ciências Agrárias da Unoeste - Rodovia Raposo Tavares, Km 572 - Bairro Limoeiro.  
CEP 19067 - 175 - Presidente Prudente - São Paulo - Fone (18) 3229-2039 / 3229-2073

**RESULTADO DE ANÁLISE QUÍMICA DE SOLO**

Página 2 de 2

SOLICITANTE : PEDRO PAULO CALDIM

PROPRIEDADE : UNOESTE

PROPRIETÁRIO : PEDRO PAULO CALDIM / CARLOS SÉRGIO TIRITAN

MUNICÍPIO : PRESIDENTE PRUDENTE - SP

**MICRONUTRIENTES**

Código	Área	Boro	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco
		( mg dm <sup>3</sup> )				
0395		0,17	1,40	23,40	10,00	2,50

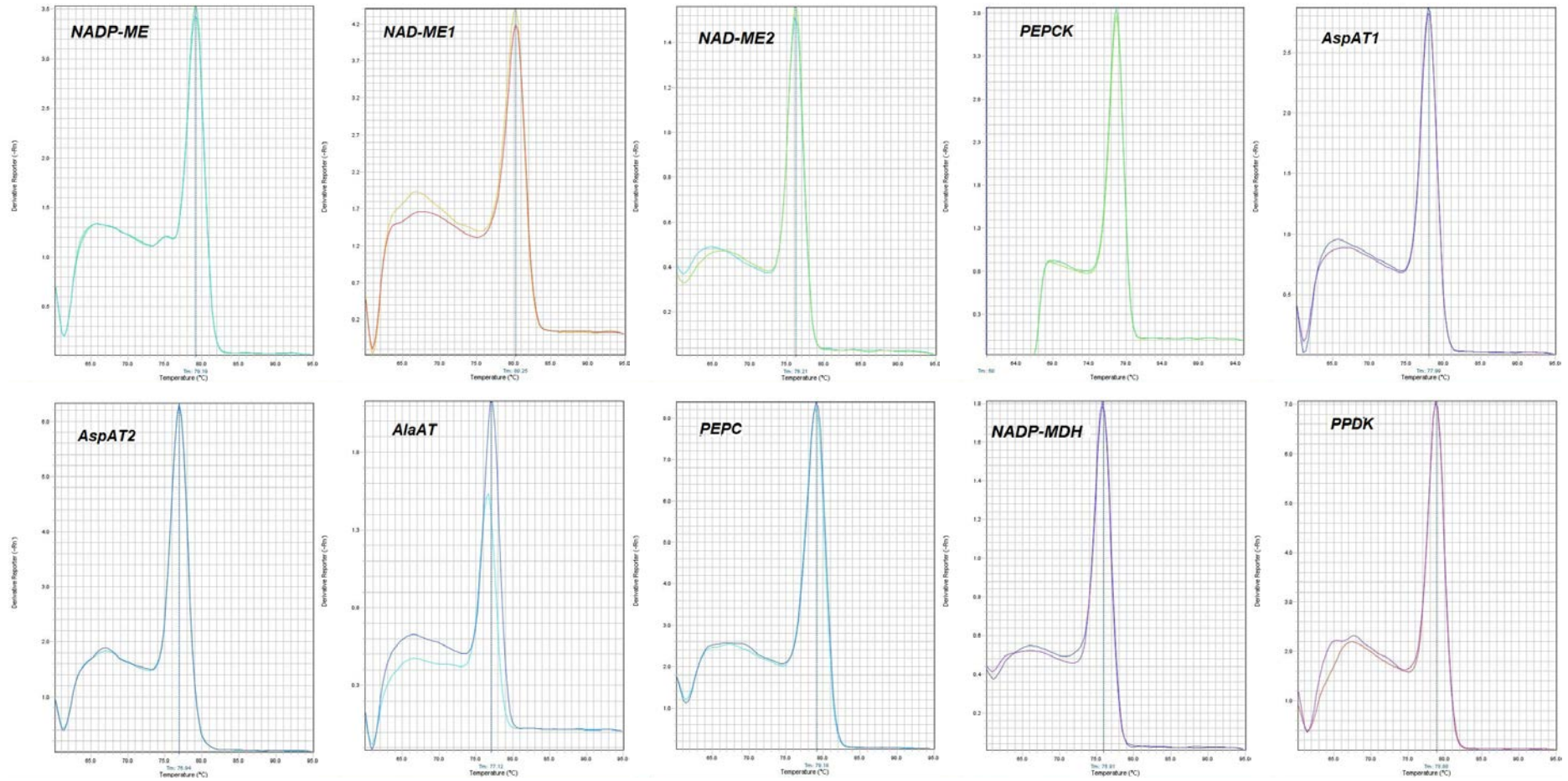
  
 Responsável Técnico  
 Carlos Henrique dos Santos  
 Engenheiro Agrônomo  
 CREA/SP 5040867863

Limites de interpretação de testes dos micronutrientes Boro (B), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn) no solo, em mg dm<sup>-3</sup>

Classe de Teores	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	(Água Quente)	(DTPA)			
Baixo	0 - 0,20	0 - 0,20	0 - 4	0 - 1,2	0 - 0,5
Médio	0,21 - 0,60	0,30 - 0,80	5 - 12	1,3 - 5,0	0,6 - 1,2
Alto	> 0,60	> 0,80	> 12	> 5,0	> 1,2

Met. de Análise : Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais. Raji et al. (2001). Instituto Agronômico de Campinas (IAC). 285 p.

ANEXO B – Curvas de *melting* dos iniciadores dos genes da via fotossintética C4.



ANEXO C – Ciclo de quantificação ( $C_q$ ) de genes envolvidos na fotossíntese em cana-de-açúcar (3 amostras para cada gene). O gráfico Boxplot mostra os valores medianos como linhas na caixa. As caixas inferior e superior indicam os quartis 1 e 3, respectivamente. As barras representam os limites superior e inferior.

