

MONITORAMENTO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM PALMITOS DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO.

Fabrício Edgar de Moraes, Maria Inês Tiraboschi Ferro, Daniele Fernanda Revoredo Jovino, Karina Maia Dabbas, João Suzuki, Roberto Willians Noda. – Inter-áreas - Ciências Agrárias - Departamento de Tecnologia – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é a terceira cultura em área cultivada no Brasil, ocupando cerca de 5,3 milhões de hectares, ficando atrás apenas da soja e do milho (FNP, 2005). Foi estimado que a produção da safra 2003/2004 chegou a 352,6 milhões de toneladas de cana, que resultaram em 14,6 bilhões de litros de álcool e 23,8 milhões de toneladas de açúcar, onde estes números fazem do Brasil novamente o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, açúcar e álcool (FNP, 2005). O estado de São Paulo é o principal produtor de cana-de-açúcar e seus derivados do Brasil, com uma área cultivada de aproximadamente 2,8 milhões de hectares e responde por 60% de todo o açúcar e álcool produzido e 70% das exportações brasileiras desses produtos (ÚNICA, 2005).

O estresse hídrico é um dos fatores mais importantes quando se pensa em aumentar a produtividade dessa cultura, as plantas podem ser afetadas se o ambiente contiver excesso ou se a quantidade ou qualidade de água disponível é insuficiente para suprir as necessidades básicas da planta (TAIZ e ZEIGER, 2002). Durante o desenvolvimento vegetal o perfil de expressão gênica pode sofrer alterações quando exposto a algum tipo de estresse. Uma resposta ao estresse é iniciada quando a planta reconhece e interpreta este estresse no nível celular. O reconhecimento do estresse ativa vias de tradução de sinais que transmitem a informação no interior da célula, levando a mudanças no padrão de expressão gênica, capazes de integrar respostas na planta como um todo, no sentido de manter o crescimento, o desenvolvimento e a capacidade reprodutiva da planta em situações adversas. A duração e a severidade do estresse determina a escala e o tempo da resposta (TAIZ e ZEIGER, 2002).

Alguns genes são necessários para a tolerância ao estresse e o acúmulo dos produtos desses genes é uma resposta adaptativa (BRAY, 1993), assim como a não ativação ou repressão da expressão de um gene pode também estar ligada ao aumento da tolerância ao estresse (NEPOMUCENO *et al.*, 2001), portanto o monitoramento da expressão gênica é um ótimo recurso para se conhecer o perfil de expressão gênica de um cultivar (LEE *et al.*, 1995).

Foram plantados toletes de cana-de-açúcar, cultivar SP80-3280, com 6,5 cm de comprimento médio e massa média de 95 g, em vasos de plástico com solo latossolo vermelho escuro, textura média. As plantas foram crescidas em casa de vegetação e a fase de estresse hídrico foi realizada também na casa de vegetação, com temperatura de 25 ± 3 °C, umidade relativa do ar média de 70 % e luminosidade natural transmitida através do plástico da casa de vegetação. Após 48 dias de brotação e crescimento as plantas foram submetidas ao déficit hídrico. No 49º dia, considerado o dia 1 no experimento, por ser o primeiro dia sem reposição de água para as plantas submetidas ao estresse hídrico. A partir de então, a cada quatro dias foram feitas coletas de amostras dos palmitos das plantas submetidas ao estresse hídrico e aferições da massa dos conjuntos para quantificação da água.

Para a preparação das membranas de alta densidade, foi utilizado DNA plasmidial de clones ESTs (Etiquetas de Sequências Expressas) oriundos do banco de dados do SUCEST e de clones das bibliotecas de estresse hídrico desenvolvidas em nosso laboratório (NODA, 2003), cuja função provavelmente está relacionada com estresse hídrico. Foram transferidas 1.202 amostras de DNA plasmidial para membrana de náilon carregada positivamente (Genetix), utilizando-se um sistema robotizado (Q-BOT-GENETIX-UK) do Centro Brasileiro de Estocagem de Genes (BCCCenter; <http://www.bcccenter.fcav.unesp.br>). As amostras foram depositadas em duplicata (mesmo clone), perfazendo um total de 2.404 ESTs por membrana. Estas membranas foram hibridadas com os cDNAs dos diferentes tempos de estresse hídrico (1, 5, 9, 13 e 17 dias) marcados com α -³³P-dCTP, para a verificação da expressão, onde os cDNAs foram obtidos através do RNA extraídos das amostras do palmito. Os sinais obtidos das imagens das membranas foram quantificados usando-se o software “Array Vision” (Imaging Research, St. Catherines, ON, Canada).

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de softwares específicos e os genes foram classificados de acordo com seu nível de significância, sendo o primeiro gene o mais

significativo e o último o menos significativo. As seqüência dos clones foram submetidas aos bancos de dados de nucleotídeos para a identificação de possíveis proteínas codificadas por eles. Para isso foi utilizado bancos de dados públicos de motivos e domínios de proteínas (Prosite, Pfam, ProDom, Interpro, entre outros).

O perfil de expressão diferencial dos clones foi obtido pela comparação entre ESTs expressos em cada intervalo de coleta comparados com o primeiro dia. Foi observado o perfil de expressão de todos os genes em cada intervalo de tempo mostrado na **Figura 1**.

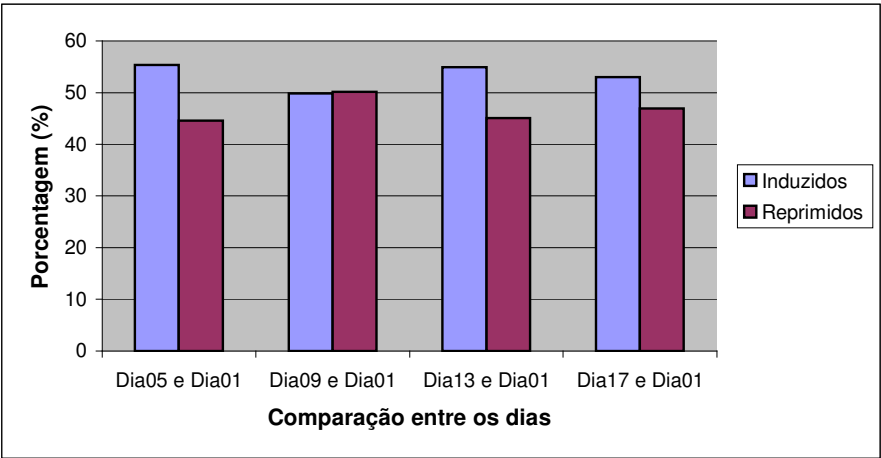


Figura 1: Gráfico da porcentagem de clones induzidos e reprimidos nos dias 5, 9, 13 e 17 de indução ao estresse hídrico em comparação com o dia 1.

Todos os clones depois de identificados foram agrupados de acordo com a categorização proposta pelo SUCEST, também foi verificado a porcentagem de genes induzidos e/ou reprimidos, em cada categoria, durante os dias de indução ao estresse hídrico como mostrado na **Tabela 1**.

Tabela 1: Porcentagem dos clones induzidos e reprimidos durante os dias 5, 9, 13 e 17 comparados com o dia 1, em suas categorias correspondentes.

CATEGORIAS	Dia05 e dia01		Dia09 e dia01		Dia13 e dia01		Dia17 e dia01	
	Induzidos (%)	Reprimidos (%)	Induzidos (%)	Reprimidos (%)	Induzidos (%)	Reprimidos (%)	Induzidos (%)	Reprimidos (%)
Metabolismo de aminoácido	76,92	23,08	52,31	47,69	53,08	46,92	50,77	49,23
Bioenergético	83,76	16,24	50,25	49,75	56,60	43,40	51,52	48,48
Comunicação celular/tradução de sinal	76,92	23,08	38,46	61,54	50,00	50,00	53,85	46,15
Dinâmica celular	85,11	14,89	46,81	53,19	48,94	51,06	51,06	48,94
Metabolismo de DNA	100,00	0,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00
Metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isoprenóides	94,29	5,71	40,00	60,00	42,86	57,14	45,71	54,29
Elementos genéticos móveis	83,33	16,67	33,33	66,67	83,33	16,67	83,33	16,67
Metabolismo de nitrogênio, enxofre e fosfato	100,00	0,00	50,00	50,00	62,50	37,50	62,50	37,50
Metabolismo de nucleotídeos	84,62	15,38	46,15	53,85	61,54	38,46	53,85	46,15

Crescimento e desenvolvimento	88,89	11,11	61,11	38,89	77,78	22,22	77,78	22,22
Metabolismo de Proteínas	84,75	15,25	38,98	61,02	49,15	50,85	38,98	61,02
Metabolismo e transcrição de RNA	77,27	22,73	50,00	50,00	54,55	45,45	54,55	45,45
Metabolismo secundário	86,75	13,25	67,18	32,82	63,36	36,64	62,60	37,40
Proteínas de estocagem	60,00	40,00	40,00	60,00	20,00	80,00	40,00	60,00
Resposta ao estresse	92,55	7,45	60,64	39,36	59,57	40,43	64,89	35,11
Transporte	92,86	7,14	35,71	64,29	35,71	64,29	57,14	42,86
Proteína putativa	81,82	18,18	50,91	49,09	56,36	43,64	54,55	45,45
Não classificadas	90,70	9,30	47,67	52,33	60,47	39,53	52,33	47,67
No Hits	86,49	13,51	40,54	59,46	56,76	43,24	51,35	48,65

A partir dos dados apresentados na **Tabela 2**, optamos pelo estudo da categoria de resposta ao estresse no qual estão incluídas as enzimas da via de síntese do ácido jasmônico, que podem estar ligadas as respostas induzidas por estresse abióticos (CREELMAN e MULLET, 1997). As enzimas participantes dessa via que estão presentes na membrana de náilon são: a Lipoxigenase, Aleno óxido sintase, Aleno óxido ciclase e a 12-Oxo-PDA redutase. O perfil de expressão dessas enzimas durante os dias em que foi induzido o déficit hídrico são apresentadas na **Figura 2**.

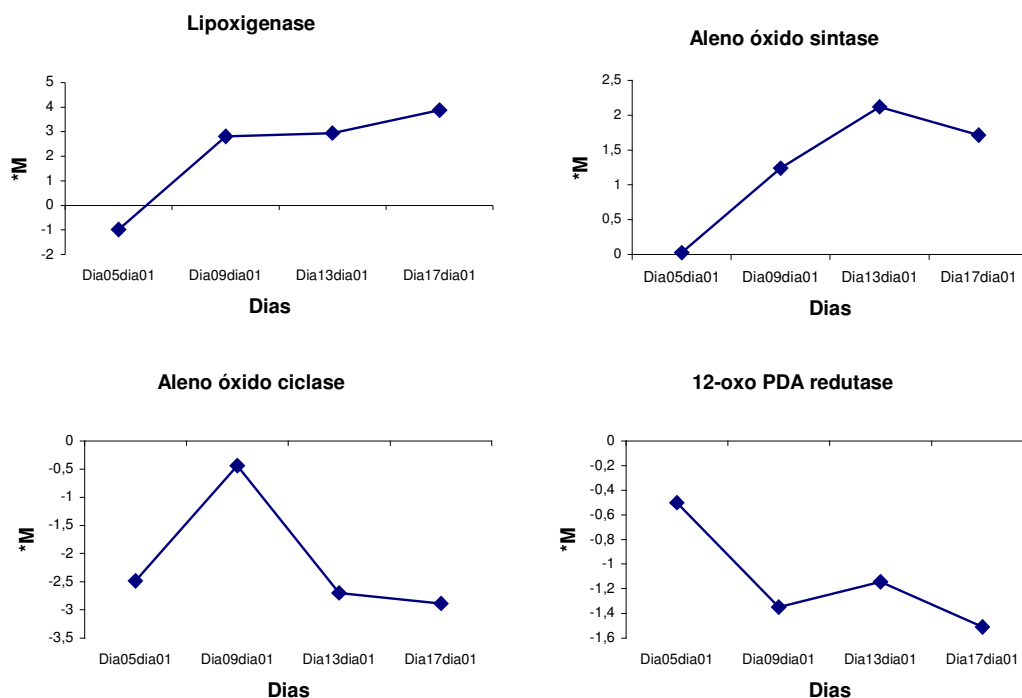


Figura 2: Perfil de expressão das enzimas participantes da via metabólica do jasmonato contidas na membrana de náilon durante a indução ao déficit hídrico. ($*M = \log_2(\text{Tratado}/\text{Controle})$)

A enzima lipoxigenase, que é a primeira enzima a atuar na via de síntese de jasmonato, apresentou um perfil de expressão crescente durante o período submetido a supressão de rega, conforme também observado em bibliotecas de cDNA de cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico por NODA (2003). Também pode-se notar um aumento na expressão da enzima aleno óxido

sintase que atua em uma segunda etapa na síntese do jasmonato. As enzimas Aleno óxido ciclase e a 12-Oxo-PDA (ácido fitodienólico) redutase mostraram em média uma redução em sua expressão. Estes resultados sugerem uma intensa regulação do processo da via de síntese do ácido jasmônico, especialmente em tecidos meristemáticos dos palmitos deste cultivar de cana-de-açúcar .

Referências Bibliográficas

BRAY, E. A. Drought-and ABA-induced changes in polypeptide and mRNA in tomato leaves. **Plant Physiology**, v. 88, p. 1210-1214. 1993.

CREELMAN R. A, MULLET J. E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 355–381, 1997.

FNP Consultoria & Comércio, **Agrianual 2005: anuário da agricultura brasileira**, p. 261-277, 2005.

LEE, N. H., WEINSTOCK, K. G., KIRKNESS, E. F., EARLE-HUGHES, J. A., FULDNER, R. A., MARMAROS, S., GLODEK, A., GOCAYNE, J. D., ADAMS, M. D., KERLAVAGE, A. R., FRASER, C. M., VENTER, J. C. Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene-expression profiles in pc-12 cells before and after nerve growth-factor treatment. **Proceedings National Academy of Sciences**, v. 92, p. 8303-8307, 1995.

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

NODA, R. W. Etiquetas de Sequências Expressas (EST) relacionadas ao estresse hídrico na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar. **Tese (Doutorado em Agronomia, Produção Vegetal, Jaboticabal) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, 2003.

TAIZ, L., ZEIGER, E. Sunderland: Sinauer Associates. **Plant Physiology**, ed. 3 p. 690, 2002.

ÚNICA – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo: Desenvolvimento sustentável e mercado de trabalho, http://www.única.com.br/pages/sociedade_mercado1.asp, 19 março 2005.

Bolsa: CNPq/PIBIC