

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DA VIA DA GLICINA BETAÍNA (CMO E BADH) EM MERISTEMA APICAL DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDA A ESTRESSE HÍDRICO. Mariana Sant'Anna Pereira, Maria Inês Tiraboschi Ferro, Nilson Nicolau Junior, Karina Maia Dabbas, João Suzuki, Marcelo Luiz Laia. – Genética – Ciências Biológicas - Departamento de Tecnologia – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal.

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma das dez mais importantes culturas mundiais sendo o Brasil maior produtor mundial desta, contribuindo com aproximadamente 386 milhões de toneladas produzidas na safra 2004/2005 (<http://www.portalunica.com.br/portalunica>). Com um grande complexo industrial o cultivo da cana-de-açúcar gera empregos e contribui para a produção de álcool combustível, energia elétrica, alimentação humana e animal, além de outros subprodutos. As plantas podem ser afetadas se o ambiente contiver excesso de água ou se a quantidade disponível é insuficiente para suprir as necessidades básicas da planta (TAIZ e ZEIGER, 2002). Neste trabalho, utilizaremos o termo estresse hídrico, como sinônimo de estresse por déficit de água. O déficit hídrico em plantas gera um complexo de respostas, começando com a percepção do estresse, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares que é finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (BRAY, 1993).

O estresse é uma resposta da planta a qualquer fator que restringe a complexa expressão do potencial de crescer, desenvolver e reproduzir. O estresse ambiental pode induzir padrões similares de resposta, que podem ser: osmoregulação, síntese de proteínas, acúmulo de solutos compatíveis, redução no crescimento, alteração nas propriedades das membranas celulares, inibição da fotossíntese, aumento da respiração, redução da produção de matéria seca, senescência e abscisão foliar, entre outras (RHODES, 1987; JONES e JONES, 1992; LANGER, 2000).

A glicina betaína, um composto de amônio quaternário que se acumula no citoplasma em resposta a altas concentrações de íons, visa manter o equilíbrio no potencial hídrico e por isso pode representar uma importante resposta adaptativa a este tipo de estresse (RHODES e HANSON, 1993). Muitas plantas acumulam significativamente glicina betaína em resposta à alta salinidade, frio e à seca. A cana de açúcar é um acumulador natural de glicina betaína, mas pouco se sabe a respeito de sua biossíntese e acumulação nas variedades utilizadas pela agroindústria. A glicina betaína é sintetizada a partir da via da colina ou da glicina, sendo duas vias distintas: desidrogenação da colina ou N-metilação da glicina. As enzimas colina desidrogenase (CDH) e betaína aldeído desidrogenase (BADH) são quase sempre encontradas no estroma dos cloroplastos (HANSON et al., 1985). O estudo das seqüências de ESTs geradas pelo projeto SUCEST fornece uma ampla quantidade de dados que podem ser usados no estudo de vias metabólicas e processos biológicos importantes, tornando possível o melhoramento genético de variedades de cana de açúcar de interesse econômico (VETTORE et al., 2001).

Com base nestas considerações, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de expressão temporal, utilizando a técnica de macroarranjos de DNA, dos genes que codificam as enzimas Colina monooxigenase (CMO) e a Betaína aldeído desidrogenase (BADH) responsáveis pela via de biossíntese da glicina betaína em cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico.

O estudo foi realizado com o cultivar SP80-3280, o experimento foi instalado em 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. Os toletes foram plantados em vasos plásticos e preenchidos com solo latossolo vermelho escuro, textura média. As plantas foram submetidas ao déficit hídrico após 48 dias de brotação e crescimento. O 49º dia, foi considerado o dia 1 no experimento, por ser o primeiro dia sem reposição de água para as plantas testemunhas. A partir de então, a cada quatro dias foram feitas coletas de amostras dos palmitos das plantas submetidas ao estresse hídrico respectivamente nos dias 5, 9, 13 e 17 foram feitas as 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 Seqüências 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 - 32 P-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. Catharines, 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 seqüências 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).

Dentre os ESTs para CMO e BADH fixados na membrana, apenas dois apresentaram indução sob estresse (Fig. A e B). Expressões diferentes entre ESTs para as mesmas enzimas, são comuns em cana-de-açúcar, visto que esta é poliplóide e pode conter várias cópias do mesmo gene em seu genoma. Dentre as diversas cópias duas ESTs que mostraram resposta importante em palmito de cana-de-açúcar (CMO: SCJFHR1030B02 e BADH: SCQGHR1013A09). Os dados obtidos indicam que a partir do 5º dia de indução do estresse houve um aumento na expressão dos genes que codificam as duas enzimas (Fig. A e B).

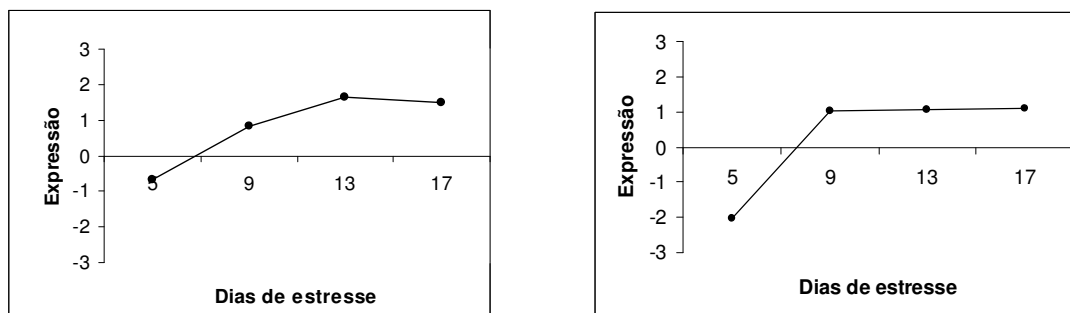


Figura A: Cinética de expressão da enzima CMO. Figura B: Cinética de expressão da enzima BADH.

Os perfis de expressão apresentados sugerem um aumento na produção de glicina betaína especialmente a partir do 9º dia. Dados semelhantes foram observados em folhas de cevada expostas a salinidade e estresse hídrico ARAKAWA (1992), em folhas de sorgo WOOD (1996) e, folhas e raízes de beterraba por MCCUE (1992). O padrão de expressão das enzimas CMO e BADH quando analisadas em folhas de plantas de cana-de-açúcar consideradas tolerantes (SP83-5073) e sensíveis (SP90-1638) ao estresse hídrico, evidenciaram segundo dados obtidos por DEMORE (2005) que nas cultivares tolerantes essas enzimas são expressas em uma fase bastante inicial do estresse e nas cultivares sensíveis ocorrem mais tardiamente. Uma análise comparativa do comportamento da expressão gênica das cultivares sensíveis e tolerantes, com os dados obtidos no presente trabalho revelaram uma maior similaridade com a cultivar sensível ao estresse hídrico, muito embora o estudo tenha sido desenvolvido em tecidos diferentes.

Referências Bibliográficas:

ARAKAWA, K.; MIZUNO, K.; KISHITANI, S.; TAKABE, T. Immunological studies of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. **Plant Cell Physiology**, v.33. p.833-84, 1992.

BRAY, E. A. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103:1035-1040

DEMORE, P.S. Análise da expressão gênica diferencial das enzimas envolvidas na via de biossíntese da glicina betaina em folhas de cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico. 2005. Trabalho de graduação em Agronomia – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

GORHAM, J. Betaines in higher plants—biosynthesis and role in stress metabolism. In: Wallsgrave RM, ed. *Amino acids and their derivatives in higher plants*. Cambridge: Cambridge University Press, 171–203, 1995.

HANSON, A.D.; MAY, A.M; GRUMET, R.; BODE, J.; JAMIESON, G.C.; RHODES, D. Betaine synthesis in Chenopods: localization in chloroplasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.82, p.3678-3682, 1985.

JONES, H.G.; JONES, M.B. **Introduction: some terminology and common mechanisms**. In: Jones, H.G., FLOWERS, T.J., JONES, M.B. (Ed.). *Plants under stress*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992, p.1-10.

LANGER, M. **Estudos e análises dos efeitos do cálcio sobre o crescimento inicial do híbrido de *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandia* in vitro**. 2000, 101p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MCCUE, K.F.; HANSON, A.D. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. **Plant Mol. Biol.**, v.18, p. 1-11, 1992.

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.

RHODES, D. Metabolic responses to stress. In: STUMPF, P.K., CONN. E.E. *The biochemistry of plants*. Academic Press, New York, cap.12, 1987, p.201-241.

RHODES, D.; HANSON, A.D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.25, p.357-384, 1993.

SAKAMOTO A.; MURATA N. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. **Plant Cell & Environment**, v.25, p.163-171, 2002.

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

ÚNICA – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo: Desenvolvimento sustentável e mercado de trabalho, <http://www.portalunica.com.br/portalunica/?Secao=referencia>, 19 mar. 2005

VETTORE, A. L.; SILVA, F.R.; KEMPER, E.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. *Genetics and Molecular Biology*, v.24 p.1-4, 2001.

WOOD, A.J.; SANEOKA, H.; RHODES, D.; JOLY, R.J.; GOLDSBROUGH, P.B. Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. Molecular cloning and expression of two related genes. **Plant Physiol**, v.110, p.1301-1308, 1996.

¹ **Bolsa:** CNPq/PIBIC