Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Plantas de cana-de-açúcar *(Saccharum* spp.*)* transformadas geneticamente com o gene *AtBI-1* submetidas ao déficit hídrico em casa-de-vegetação

Mariana de Almeida Barbosa

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2013

Mariana de Almeida Barbosa
Licenciada em Ciências Biológicas

Plantas de cana-de-açúcar *(Saccharum* spp.*)* transformadas geneticamente com o gene *AtBI-1* submetidas ao déficit hídrico em casa-de-vegetação

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profª. Drª. **HELAINE CARRER**

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Piracicaba
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Barbosa, Mariana de Almeida
Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) transformadas geneticamente com o gene *AtBI-1* submetidas ao déficit hídrico em casa-de-vegetação / Mariana de Almeida Barbosa.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
82 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Morte celular programada 2. Catalase 3. Ascorbato peroxidase 4. Prolina 5. Transformação genética de plantas 6. *Bi-1* I. Título

CDD 633.61
B238p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Genivaldo e Regina,
minhas irmãs, Marina e Fernanda,
ao meu marido, Maurílio,
e a minha filha, Maria Clara,
por serem o sustento da minha existência.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pela oportunidade de realizar este mestrado e por derramar todos os dias bênçãos em minha vida.

À Nossa Senhora, por me iluminar e amparar em todos os momentos da minha vida.

À Profª. Drª. Helaine Carrer, pela oportunidade, paciência, compreensão e ensinamentos.

À Universidade de São Paulo, e ao programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela infraestrutura e conhecimentos oferecidos durante a realização do curso.

À secretária Solizete G. Silva pela ajuda em todos os momentos.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida no inicio do curso.

À FAPESP pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Dr. Daniel Alves Ramiro pela imensurável colaboração.

Ao Dr. Enio Tiago de Oliveira, pela colaboração e ensinamentos.

À MSc. Fátima Valentina de Martin pelos ensinamentos diários, colaboração, paciência, companhia e amizade.

Ao doutorando André Barbosa, pelos ensinamentos, acolhida e amizade.

À MSc. Tatiana Bistaco pelos ensinamentos e amizade.

Ao companheiro de laboratório Flavio dos Santos pela colaboração nos experimentos.

Aos amigos de laboratório Martha Chaddad, Simone Tanaka, Esteban Galeano, Geraldo Silva e aos demais amigos de curso pela companhia, acolhida e amizade.

Ao Posto, Sami, Meke, Xanis e Hã pela torcida, amizade e eterno carinho que a distância e o passar dos anos não apagam.

Aos meus avós e familiares que colaboraram de alguma forma e dedicaram orações a mim.

Aos meus sogros, pela torcida e colaboração.

Aos meus cunhados e cunhadas pelo incentivo.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida, pela minha formação, por não medirem esforços para a realização dos meus sonhos e por me ensinarem a não desistir nunca.

Às minhas irmãs pela companhia e torcida.

Ao meu marido, pelo amor, carinho, paciência, colaboração sem medidas e por ser meu porto seguro nos momentos difíceis.

À minha filha, que é a minha razão de querer lutar por dias melhores.

MUITO OBRIGADA.

“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais voltará a seu tamanho inicial.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....11
ABSTRACT.....13
1 INTRODUÇÃO 15
1.1 Objetivos..... 17
1.1.1 Objetivo geral..... 17
1.1.2 Objetivos específicos..... 17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1 Cana-de-açúcar 19
2.2 Estresse em plantas..... 21
2.2.1 Estresse Biótico 21
2.2.2 Estresse abiótico: Déficit hídrico e resposta das plantas 24
2.3 Prolina..... 27
2.4 Morte celular programada 28
2.5 Espécies ativas de oxigênio e estresse oxidativo 31
2.6 Sistema antioxidante 32
2.6.1 Catalase (CAT) 33
2.6.2 Ascorbato peroxidase (APX) 34
2.6.3 Guaiacol Peroxidase (GPOX) 34
2.7 Família de proteínas Bcl-2 e sua relação com apoptose dependente de mitocôndria e estresse no retículo endoplasmático. 34
2.8 O gene BI-1 e seu homólogo *AtBI-1* 37
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 39
3.1 Material Vegetal..... 39
3.2 Aclimatação das plantas em casa de vegetação 41
3.3 Inoculação da ferrugem marrom *(Puccinia melanocephala)* 41
3.4 Experimentos de Estresse Hídrico 41
3.4.1 Experimento 1: imposição de déficit hídrico em plantas de 90 dias 42
3.4.1.1 Metodologias usadas no experimento 1..... 43
3.4.1.1.1 Parâmetros morfológicos 43
3.4.1.1.2 Avaliação do comportamento estomático e fotossintético das plantas..... 43
3.4.1.1.3 Avaliação do conteúdo relativo de água nas folhas..... 43
3.4.2 Experimento 2: imposição de déficit hídrico em plantas de 60 dias 44
3.4.2.1 Metodologias usadas no experimento 2..... 44

3.4.2.1.1 Quantificação Prolina 44
3.4.2.1.2 Extração de proteínas totais 45
3.4.2.1.3 Quantificação proteínas totais 45
3.4.2.1.4 Atividade da Guaiacol Peroxidase (GPOX)..... 45
3.4.2.1.5 Atividade da Catalase (CAT) 45
3.4.2.1.6 Atividade da Ascorbato peroxidase (APX)..... 46
3.5 Análise estatística..... 46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 47
4.1.1 Inoculação do fungo da ferrugem marrrom (*Puccinia melanocephala)* 47
4.2 Experimento 1: imposição de déficit hídrico em plantas de 90 dias..... 48
4.2.1 Comportamento estomático e fotossintético das plantas 48
4.2.1.1 Taxa Fotossintética.....47
4.2.1.2 Condutância estomática 52
4.2.2 Conteúdo relativo de água nas folhas (RWC)..... 54
4.2.3 Parâmetros Morfológicos..... 56
4.3 Experimento 2: imposição de déficit hídrico em plantas de 60 dias..... 57
4.3.1 Taxa Fotosssintética 57
4.3.2 Prolina..... 58
4.3.3 Atividade enzimática: Guaiacol peroxidase (GPOX), Ascorbato peroxidase (APX) e Catalase (CAT)..... 59
5 CONCLUSÕES 65
REFERÊNCIAS 66

RESUMO

Plantas de cana-de-açúcar *(Saccharum spp.)* transformadas geneticamente com o gene *AtBI-1* submetidas ao déficit hídrico em casa-de-vegetação

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas agrícolas no cenário econômico e social brasileiro. Na cultura de cana-de-açúcar o estresse hídrico é o principal fator limitante para o aumento de produtividade, sendo responsável por alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas, que podem deflagrar perturbações metabólicas que ativam a morte celular programada (MCP). Sabendo-se que o gene *BI-1* apresenta o potencial de reduzir os efeitos da MCP desencadeado por estresses bióticos e abióticos em plantas, este trabalho teve como objetivo analisar plantas transgênicas de cana-de-açúcar que expressam o gene *BI-1* de *Arabidopsis thaliana* (*AtBI-1*) em condições de estresse hídrico. Também, plantas transgênicas e controle foram inoculadas com o fungo *Puccinia melanocephala* demonstrando que o processo de transformação genética com o gene *AtBI-1* alterou as características pré existentes de resistência a ferrugem marrom nas plantas transgênicas. Os estudos de tolerância ao défict hídrico foram realizados em dois experimentos, o experimento 1 com plantas transgênicas e controles de 90 dias e o experimento 2 com plantas de 60 dias. Plantas do experimento 1 foram analisadas quanto características morfológicas como número de estômatos e tricomas, altura e circunferência do colmo e após ficarem 24 dias sem água foram analisadas quanto a taxa fotossintética, comportamento estomático e conteúdo relativo de água nas folhas, enquanto no experimento 2 as plantas foram analisadas quanto aos teores de prolina, atividades das enzimas guaiacol peroxidase (GPOX), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) após as plantas ficarem 17 dias sob déficit hídrico. Estas enzimas estão envolvidas em processos de desativação de elementos ativos de oxigênio. Os resultados demonstraram que as plantas transgênicas expressando o gene *AtBI-1* possuem fenótipo de menor altura, e maior taxa fotossintética, maior comportamento estomático e maior conteúdo relativo de água nas folhas, e assim apresentam maior tolerância ao déficit hídrico que plantas controle. Contudo, houve baixo acúmulo de prolina, baixa atividade da GPOX, APX e CAT nas plantas transgênicas durante o estresse hídrico comparada com as plantas controle do mesmo tratamento. Porém foi observado alta atividade constitutiva da catalase nas plantas transgênicas. A atividade da catalase nestas plantas transgênicas sugere a possibilidade da interação entre *AtBI-1* e calmudolinas. Futuros estudos podem contribuir para elucidar se a proteína BI-1 é essencial para a ativação das catalases por calmudolinas.

Palavras-chave: Morte celular programada; Catalase; Ascorbato peroxidase; Prolina;

Transformação genética de plantas; *Bi-1*.

ABSTRACT

Plants of sugarcane (*Saccharum spp.)* genetically transformed with the gene *AtBI-1* subjected to water deficit in green-house

Sugarcane is one of the main agricultural crops in the Brazilian social and economic scenario. Water stress in the culture of sugarcane is the main limiting factor for increasing productivity accounting for physiological, biochemical and molecular plants that can trigger metabolic disturbances activating programmed cell death (MCP). Knowing that the *BI-1* gene has the potential to reduce the effects of MCP triggered by biotic and abiotic stresses in plants, this study aimed to analyze transgenic sugarcane that express the *BI-1* gene of *Arabidopsis thaliana* (*AtBI-1*) under water stress. Also, transgenic and control plants were inoculated with *Puccinia melanocephala* fungus demonstrating that the genetic transformation process with the *AtBI-1* gene altered the pre-existing characteristics of brown rust resistance in transgenic plants. Studies of tolerance to water deficit were performed in two experiments, the experiment 1 was prepared with transgenic and control plants with 90 days and the experiment 2 used plants with 60 days. Plants from experiment 1 were analyzed as for morphological characteristics such as number of stomata and trichomes, height and diameter of stem after plants being under water for 24 days as were analyzed photosynthetic rate, stomatal behavior, relative water content in leaves while in the experiment 2, plants were analyzed for the levels of proline, enzyme activities of guaiacol peroxidase (GPOX), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) under water deficit for 17 days. These enzymes are involved in deactivation of active elements oxygen. The results demonstrated that the transgenic plants expressing the *AtBI-1* gene presented the phenotype of lower height, higher index of leaf area, higher photosynthetic rate, higher stomatal behavior and higher relative water content in leaves than control plants increasing tolerance to drought stress. However, there were low levels of proline, low activity of GPOX activity, APX and CAT in transgenic plants during drought stress compared to control plants of the same treatment, but the observed high constitutive activity of catalase in transgenic plants. Catalase activity in these transgenic plants suggests the possibility of interaction between *AtBI-1* and calmudolinas. Future studies may contribute to understand whether the *BI-1*protein is essential for the activation of catalase by calmudolinas.

Keywords: Programmed cell death; Catalase; Ascorbate peroxidase; Proline; Genetic transformation of plants; *Bi-1*.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é de grande importância nas regiões tropicais e subtropicais. É de especial significado econômico para alguns países da América Central e do Sul, principalmente para o Brasil, maior produtor mundial, com a safra 2012/13 atingindo a produção de 595,13 milhões de toneladas, segundo estudo realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento – Conab, em dezembro de 2012. No país, a agroindústria canavieira mantém, além da produção de açúcar, o maior sistema de produção de energia comercial de biomassa no mundo, através do etanol e do uso do bagaço (MENOSSI et al., 2007; SOUZA; SILVA, 2002).

A população mundial cresce a cada ano. Em 1950 éramos 2,5 bilhões, em 2000, 6 bilhões, e pelos últimos dados da ONU de outubro de 2011 somos 7 bilhões de pessoas, este crescimento populacional recai diretamente sobre a agricultura e fontes renováveis de energia que devem então, elevar seu potencial a cada ano. A cultura da cana-de-açúcar sendo fonte de alimento e de biocombustíveis é considerada de grande importância para o desenvolvimento e faz-se necessária sua expansão produtiva**.** Uma solução proposta por Begcy et al. (2012) está em utilizar terras abandonadas e degradadas e, assim aumentar a produção das culturas.

A saturação das regiões com aptidão para a cana-de-açúcar tem pressionado o deslocamento da fronteira agrícola para regiões não tradicionais no plantio desta cultura. Uma das principais áreas de expansão para a cultura da cana no Brasil é a região dos cerrados, marcada pela produção de grãos e pela criação de gado, que agora está se voltando para a produção canavieira. Entretanto, os cerrados também são caracterizados pela elevada salinidade do solo e pelos longos períodos de estiagem. Por isso, fatores ambientais destas novas áreas podem não serem adequados às necessidades da cultura da cana-de-açúcar.

Um dos pontos que mais influenciam negativamente uma cultura é o estresse abiótico e biótico. O estresse abiótico é responsável por perdas de até 70% na produtividade sendo que a deficiência hídrica é o principal fator limitante (BOYER, 1982; MAYBANK et al.,1995; SILVA et al., 2008;). O estresse biótico é devido ao ataque de patógenos que causam grandes prejuízos econômicos (ZHU, 2002). Tanto o estresse abiótico como o biótico podem provocar alterações e respostas em todos os níveis funcionais do organismo vegetal e inclusive deflagrar a morte celular programada (MCP) (LARCHER, 2000).

A MCP é um processo associado a características morfológicas e bioquímicas distintas que envolvem vias de sinalização, controlando a destruição das células (PALLAVAN-UNSAL; BUYUKTUNCER; TUFEKCI, 2005). Este mecanismo faz parte do

desenvolvimento normal e da homeostase dos metazoários e é controlado por proteínas anti-MCP e pró-MCP. Em plantas os mecanismos que regulam a MCP são pouco conhecidos, para Gadjev, Stone e Gechev (2008) os elementos ativos de oxigênio (EAOs) se destacam nesta função. Um gene candidato a regulador da MCP em mamíferos é o *Bax Inhibitor-1* (*BI-1*) que codifica uma proteína anti-MCP (WATANABE; LAM, 2009). Descobertas recentes sugerem que a proteína BI-1 está envolvida na via de resposta aos estresses do retículo endoplasmático, com a finalidade de modular a indução da morte celular ativada por diversos tipos de estímulos (BOLDUC et al., 2003; KAWAI-YAMADA; OHORI; UCHIMIYA, 2004; KAWAI-YAMADA et al., 2009). Proteínas semelhantes a BI-1foram identificados em várias espécies de plantas como, *Oryza sativa* (arroz), *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare* (cevada), *Brassica napus* (couve-nabiça) e *Nicotiana tabacum* (tabaco) (BOLDUC et al., 2003; HUCKELHOVEN; DECHERT; KOGEL, 2003; KAWAI; REED e UCHIMIYA, 1999; KAWAI-YAMADA et al., 2001; LAM; KATO; LAWTON, 2001; SANCHEZ; TORRES; ZEBALA, 2000). A superexpressão do gene *BI-1* foi capaz de atenuar a MCP induzida por Bax e estresses abióticos em varias espécies vegetais (CHAE et al., 2003; KAWAI-YAMADA et al., 2001; KAWAI-YAMADA; OHORI; UCHIMIYA, 2004).

Desta maneira, o desenvolvimento de novas variedades que congreguem alta produtividade com níveis superiores de tolerância ao déficit hídrico é um ponto estratégico para a expansão da cultura canavieira (SINGH; REDDY, 1980).

No laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), do Departamento de Ciências Biológicas - ESALQ/USP em Piracicaba-SP, foram obtidas plantas transgênicas de cana-de-açúcar, a partir da variedade RB835089, expressando o gene *BI-1* de *Arabidopsis thaliana (AtBI-1)* (MELOTTO-PASSARIN, 2009). Estas plantas transgênicas foram introduzidas em casa-de-vegetação e um experimento com inoculação do fungo da ferrugem marrom *(Puccinia melanocephala)* foi realizado. *Puccinia m.* é um basiodiomiceto biotrófico que pode causar grandes prejuízos econômicos para a cultura de cana-de-açúcar (PEIXOTO-JÚNIOR, 2011). E posteriormente dois experimentos para estudo do efeito do déficit hídrico também foram realizados.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o nível de tolerância ao déficit hídrico de plantas de cana-de-açúcar modificadas geneticamente com o gene *AtBI-1*.

1.1.2 Objetivos específicos

Plantas transgênicas e controles foram analisadas quanto a:

- A quebra ou não, de resistência ao fungo da ferrugem marrom *(Puccinia melanocephala)*;

- Sensibilidade ao déficit hídrico em relação ao comportamento estomático e fotossintético;

- Diferenças no conteúdo relativo de água na folhas durante o déficit hídrico;

- Características morfológicas como, número de estômatos e tricomas, altura e circunferência do colmo;

- Teores de prolina nas plantas submetidas ao déficit hídrico;

- Defesa antioxidativa estimada por meio de alterações na atividade das enzimas guaiacol peroxidase, ascorbato peroxidase e catalase nas plantas submetidas ao déficit hídrico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta C4, ou seja, possui um mecanismo de pré-fixação do carbono (ZABALETA et al., 2012). O carbono é absorvido pelas células do mesofilo, encontrando-se no citoplasma no formato de HCO_3^-. Este reage com o fosfoenolpiruvato pela ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase), sendo então, estocado em forma de malato ou aspartato, que posteriormente será transportado as células da bainha do feixe, onde sofrerá a ação de uma enzima de descarboxilação, no caso do malato a NAD-málica, para então liberar CO_2 e entrar no ciclo de Calvin.

Entre as plantas com valor agronômico a cana-de-açúcar é a que tem a maior taxa fotossintética (CRISTOFOLETTI-JUNIOR, 2012), sendo os fotoassimilados armazenados como sacarose no colmo, especificamente nos vacúolos centrais das células parenquimáticas do mesmo (MOORE; MARETZKI, 1996).

Sua classificação taxinômica segundo Cronquist (1981) é a seguinte: divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Cyperales, família Poaceae, gênero *Saccharum*. Atualmente nas lavouras encontramos híbridos vindos de sucessivas seleções. Os híbridos são altamente poliplóides e aneuplóides e contém, em média, 100-120 cromossomas, sendo que em variedades comerciais este número pode ser diferente (MENOSSI et al. 2007). As variedades comerciais atuais são capazes de armazenarem cerca de 20% de sua matéria fresca em forma de sacarose, contrapondo variedades antigas que eram capazes de acumular por volta de 2% (MOORE, 2005; ZHU et al., 1997).

A arquitetura da planta de cana-de-açúcar baseia-se em parte aérea constituída de folhas, colmos e quando em período de reprodução inflorescência (nas variedades comerciais atuais este mecanismo foi atenuado pelo processo de melhoramento) e parte subterrânea que contem raízes e rizomas, que ao longo do desenvolvimento do vegetal poderão formar novos perfilhos e constituir uma touceira (SEGATO et al., 2006).

A cana-de-açúcar possui quatro estádios de fenologia (GASCHO; SHIH, 1983) (Figura 1) no seu ciclo de vida, sendo:

1) brotação e estabelecimento dos colmos primários;

2) perfilhamento e estabelecimento da cultura;

3) crescimentos dos colmo e início do acúmulo de sacarose;

4) maturação.

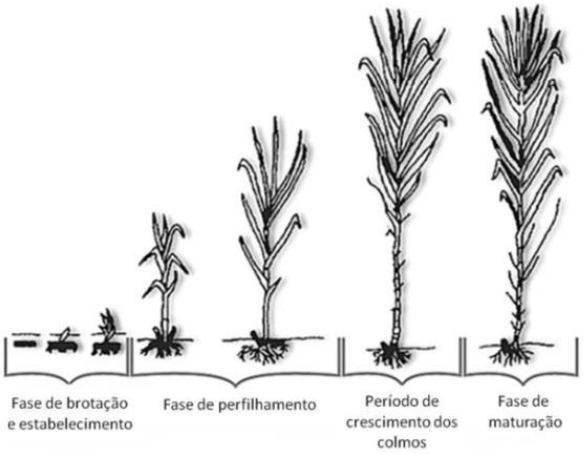


Figura 1- Estádios fenológicos da cana-de-açúcar (GASCHO; SHIH, 1983)

Dados recentes da Conab apontam que o total de cana-de-açúcar moída na safra 2012/13 teve um acréscimo de 6,2% em relação à safra 2011/12, que foi de 560,36 milhões de toneladas, apontando que o montante moído foi de 34,76 milhões de toneladas a mais que na safra anterior. A produção de cana-de-açúcar da Região Centro-Sul deve ser de 535,43 milhões de toneladas, 8,2% maior que a produção da safra anterior. A produtividade média brasileira, na safra 2012/13, está estimada em 69.846 kg/ha, 4,2% maior que na safra 2011/12, que foi de 67.060 kg/ha.

O sucesso da cana-de-açúcar deve-se basicamente à utilização de variedades superiores oriundas dos programas de melhoramento genético que têm por objetivo a introdução de fatores de interesse (VETTORE et al., 2001). Dentre estes fatores, a resistência contra pragas e patógenos, o aumento do teor de sacarose, a resistência aos herbicidas e a tolerância aos estresses ambientais ocupam posição de destaque (CIDADE et al., 2006). Porém, a obtenção de uma nova variedade mais produtiva, é um processo laborioso, de longa duração (entre 12 a 15 anos), que é dificultado pela complexidade do genoma poliplóide da cana-de-açúcar, de sua base genética estreita e da reprodução naturalmente limitada pela baixa fertilidade e ciclo de vida longo (CESNICK; MIOCQUE, 2004; MELOTTO-PASSARIN, 2009).

A biotecnologia, por meio da transformação genética de plantas, pode e deve ser aplicada nos programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar para superar ou reduzir as limitações encontradas no melhoramento convencional, pois a introdução de novos genes específicos pelo retrocruzamento (cruzamento de um híbrido com um indivíduo geneticamente similar aos seus genitores ou os próprios, buscando conservar uma característica desejada) não é garantida no processo de meiose, onde haverá rearranjo genético

ao acaso dos genes (IJAZ, 2012). A aplicação da biologia molecular e da transformação genética é muitas vezes a única maneira de introduzir novos caracteres de valor agronômico e comercial em cana-de-açúcar.

O benefício adicional das cultivares transgênicas é a manutenção desta por meio da propagação vegetativa o que viabiliza a multiplicação em larga escala comercial (GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996). Desta maneira, a cana-de-açúcar tem adquirido posição de destaque no âmbito científico e tecnológico, usufruindo de investimentos significativos em pesquisas biotecnológicas, promovendo o avanço do conhecimento em áreas relacionadas à produção de bioenergia no Brasil.

A variedade RB835089, advinda do melhoramento convencional, foi escolhida para este trabalho. É proveniente do Programa de Melhoramento Genético da cana-de-açúcar conduzido pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos - CCA/UFSCar, destaca-se pela alta produtividade agrícola, teor de sacarose médio, ampla adaptabilidade, estabilidade e resistência ao fungo da ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*). E ainda por apresentar um excelente comportamento *in vitro* (RIDESA, 2008).

2.2 Estresse em plantas

Plantas repetidamente enfrentam situações de estresses. Podendo ser abióticos, tais como, estiagem, salinidade, resfriamento, congelamento, alta temperatura, alagamento ou intensa luminosidade; e estresses bióticos, infestações de pragas e herbívora, quando estão em condições de campo.

Estresses são situações ao redor da planta que a leva a uma condição negativa, (TAIZ; ZEIGER, 2004) uma perda das condições ótimas para a vida, provocando alterações e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, os quais podem voltar ao normal de início, porém corre-se o risco de se tornarem irreversíveis (LARCHER, 2000) e qualquer uma destas situações podem em casos extremos, levar a planta à morte (JIANG; ZHANG, 2002; XIONG et al., 2002; MITTLER; BLUMWALD, 2010).

2.2.1 Estresse Biótico

Com relação aos estresses bióticos, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa variados. A interação entre planta e patógeno é complexa e dinâmica (COLL; EPPLE;

DANGL, 2011). Sendo as plantas organismos sésseis, a evolução de um sistema imune autônomo das células, fez-se necessário.

Existem basicamente dois tipos de patógenos, os biotróficos, que se alimentam das células vegetais vivas e os necrófagos, que utilizam os nutrientes das células vegetais mortas ou próximas a morrerem. Estes patógenos criaram mecanismos para induzir a morte celular nos seus hospedeiros por fitotoxinas e enzimas degradantes das paredes das células, o que resulta na formação de lesões necróticas no tecido vegetal infectado (ALFANO, COLLMER, 1996; WALTON, 1996).

Segundo Dangl, Dietrich e Thomas, 2000 pode-se classificar a interação planta-patógeno de duas maneiras: (1) quando o organismo hospedeiro é susceptível ao agente patogênico e não oferece resistência, a interação é definida como compatível; (2) quando o agente hospedeiro origina uma resposta de defesa ao ataque do agente patogênico, a interação é definida como incompatível.

Geralmente as interações entre plantas e patógenos biotróficos ativam vias de resposta gene-a-gene nas células das plantas infectadas, onde o gene dominante do patógeno, dito gene de avirulência, é reconhecido pelo gene dominante da planta, dito gene de resistência (FLOR, 1995). Essa ligação, gene de avirulência com gene de resistência, desencadeia a resposta de defesa da planta quando a interação planta patógeno não é compatível, acionando então diversas respostas fisiológicas na planta (FLOR, 1955; NINCHUK et al., 2003).

Os mecanismos de defesa a estes patógenos são divididos em dois grupos principais: (i) resistência pré-formada, que a planta continha antes do ataque do agente patogênico; e (ii) resistência pós-formada, que a planta produz somente após contato com o agente patogênico. As repostas pós-formadas podem ser locais, como resposta de hipersensibilidade (RH), ou além do local de infecção, como a resposta sistêmica adquirida (RSA) (HAMMERSCHIMIDT, 1999; LAM; KATO; LAWTON, 2001). O que diferencia a RH da RSA é que ela acontece no local de contato com o agente externo (MAUCH et al, 2001).

Os patógenos biotróficos têm o interesse de evitar RH e posterior morte de célula infectada. Para isso secretam substâncias que inibem a RH. *Pseudomonas syringae* secreta uma proteína, efetor tipo III que é capaz de suprimir RH em tabaco e *Arabidopsis thaliana* (GUO et al., 2009; JAMIR et al., 2004). RH em tabaco também pode ser suprimida por efetores de *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* (FUJIKAWA et al., 2006).

A primeira linha de defesa em plantas aos patógenos biotróficos é regulada por receptores transmembranas chamados de receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), que reconhecem microrganismos e ou padrões de moléculas danosas (MAMPs) (POSTEL,

KEMMERLING, 2009). A classe mais estudada de RRPs são os receptores - like quinases (RLKs), que apresentam um domínio rico e repetido de leucinas (LRR), envolvidas na percepção de MAMPs, e um domínio quinase intracelular, (NON-RD-quinase) que leva a ativação de genes de defesa da planta (JONES, DANGL, 2006) (Figura 2).

Caso o agente patogênico passe por esta barreira a segunda estratégia de defesa é iniciada. Efetores de imunidade ativam NB-LRR, (que podem ser de dois tipos CC-NB-LRRs ou TIR-NB-LRRs) que são proteínas de resistência a doenças, que agem como sentinelas do sistema imunológico intracelular (LUKASIK, TAKKEN, 2009). O reconhecimento do patógeno por NB-LRRs, leva à sua inibição de crescimento, que é normalmente, mas nem sempre, acompanhada pela resposta de hipersensibilidade (RH), uma forma de impedir a invasão do patógeno (Figura 2). A geração EAOs e óxido nítrico (NO) são sinais essenciais para o desenvolvimento de RH (DELLEDONNE et al., 1998). As características desta morte célula por ativação de RH são encolhimento citoplásmico, condensação de cromatina com clivagem do DNA nuclear, inchaço mitocondrial, vacuolização, produção de H_2O_2 e colapso do citoplasma (HEATH, 2000).

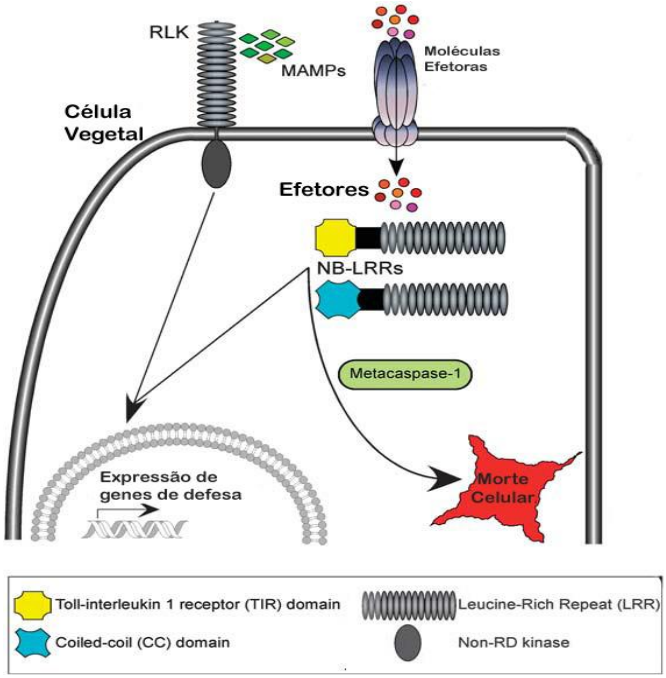


Figura 2- Mecanismo de reconhecimento de patógeno biotrófico por receptores de membrana intracelular, levando à cascata de sinalização que culminam na expressão de genes relacionados com defesa ou morte celular programada (Figura retirada de COLL et al., 2001 com modificações).

Um exemplo de patógeno biotrófico é o basiodiomiceto *Puccinia melanocephala*, causador da ferrugem marrom. Esta doença pode causar grandes prejuízos econômicos para a

cultura de cana-de-açúcar (PEIXOTO-JÚNIOR, 2011). O primeiro relato da doença foi em *Erianthus ravennae* (SATHE, 1971). A infestação de ferrugem marrom em plantas de cana-de-açúcar nos primeiros estádios de desenvolvimento pode levá-las a morte, devido redução de crescimento de raízes, taxa fotossintética e assimilação de metabólitos (PEIXOTO-JÚNIOR, 2010).

Além da ferrugem marrom existe mais um tipo de ferrugem que ataca plantas de cana-de-açúcar, é a ferrugem alaranjada causada pelo fungo *Puccinia kuehnii* (VIRTUDAZO; NOJIMA; KAKSHIMA, 2001). A ferrugem marrom e alaranjada podem ser diferenciadas pela coloração dos esporos, formato das pústulas e localização das lesões nas folhas (VIRTUDAZO; NOJIMA; KAKSHIMA, 2001).

A ferrugem marrom se desenvolve com facilidade em climas úmidos (umidade relativa acima de 70%) e em temperaturas que vão de 17º C a 30ºC. O ciclo de vida do fungo é curto, dentro de 5 à 6 semanas, quando a produção de pústulas é grande e visível na face abaxial da folha (RYAN; EGAN, 1989).

Durante o desenvolvimento da doença as pústulas agrupam-se, formando placas de tecido necrosado. Segundo Saciloto (2003) esses conjuntos de pústulas, que ocorrem nas folhas mais velhas, acarretam na necrose dos tecidos prejudicando o crescimento e consequentemente, a produção de cana-de-açúcar. Estes tecidos necrosados podem ser oriundos de uma RH, na tentativa de impedir o avanço da doença.

Algumas características fisiológicas de RH se assemelham a morte celular programada em animais (LAM; KATO; LAWTON , 2001; HEATH, 2000). Sendo que a morte celular induzida por *Bax* de mamíferos em tabaco é semelhante a RH (LACOMME; SANTA CRUZ, 1999). A morte celular programada e a RH, acontecem depois da produção elevada de EAOs e podem ser deflagradas por estresse biótico e estresse abiótico.

2.2.2 Estresse abiótico: Déficit hídrico e resposta das plantas

Dentre os estresses abióticos, o déficit hídrico é o principal fator limitante da produção agrícola em diversas regiões do planeta. Déficit hídrico é a circunstância que a planta passa por indisponibilidade de água no solo e no ar (PASSIOURA, 1997).

Cada espécie de planta responde de forma particular ao déficit hídrico, e dentro de cada espécie suas variedades também podem ter respostas diferentes (LUDLOW, 1976).

O déficit hídrico prolongado pode causar danos e prejudicar o desenvolvimento de células e tecidos, e em culturas de valor econômico diminuir a produtividade e causar grandes prejuízos (ZHU, 2002). Os estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar que mais sentem

os efeitos da falta de água no solo são o segundo e o terceiro, refletindo na fase de maturação (Figura 1), comprometendo o intenso acúmulo de sacarose nos colmos. Entretanto é interessante saber que a cana-de-açúcar necessita passar por uma falta de água, não total, mas parcial, para que exista o início do processo de maturação (BEGCY et al., 2012).

A vinhaça, subproduto da produção de etanol, é o que supre as necessidades hídricas da cultura no Brasil, já que a maioria das plantações não são irrigadas devido ao ônus que requer tal prática (CIA, 2010). Nas próximas décadas, caso as perspectivas de aquecimento global se confirmem, espera-se a ampliação de regiões classificadas como áridas e semi-áridas, caracterizadas por índices baixos e irregulares de precipitação e por uma elevada taxa de evaporação (PALL et al., 2007; SOLOMON et al., 2009).

Durante o déficit hídrico as plantas respondem de modos diferentes. Elas podem se aclimatarem, ou seja, se ajustarem às novas condições do ambiente, através de mecanismos morfológicos e bioquímicos ou as plantas podem já serem tolerantes as mudanças impostas pelo ambiente devido ao seu genótipo que lhes conferem um fenótipo já adaptado (TAIZ; ZEIGER, 2004). Adaptação é conferida as espécies através de anos de evolução, pela seleção natural ou pode ser resultado de processos de melhoramento e transformação genética.

Os vegetais sob déficit hídrico, volume de água presente nas células e tecidos menor do que o encontrado em situação de máxima hidratação, apresentam diminuição do volume celular e progressiva desidratação do protoplasma. Em plantas de cana-de-açúcar é observado enrolamento das folhas quando estas estão sob déficit hídrico (INMAM- BAMBER; SMITH, 2005). Este mecanismo reduz a área foliar sendo a primeira estratégia de defesa da planta contra a falta de água (TAIZ; ZEIGER, 2004), pois diminuí a superfície exposta à dessecação (INMAM-BAMBER; SMITH, 2005). A desidratação do protoplasma provoca aumento na distância da membrana plasmática da célula da parede celular da mesma. TAMURA et al. (2003) mostraram que esta diferença de pressão de turgidez é percebida pelo gene NtC7, em tabaco, que produz uma proteína receptora de membrana, capaz de aumentar a tolerância ao déficit hídrico quando o gene é superexpresso .

A transdução do sinal recebido ativa vias de sinalização que englobam reações proteína-proteína e moléculas como o Ca^{+2} e EAOs, que por sua vez irão ativar genes de resposta ao estresse (BARTELS; SUNKAR, 2005). Estes genes codificam enzimas envolvidas na biossíntese de osmoprotetores (trealose, glicina-betaína, prolina), enzimas e compostos antioxidantes (CIA, 2010).

A relação entre o que a parte aérea produz na fotossíntese e a água que é absorvida pela raíz, ditam as proporções entre peso seco da parte aérea e das raízes. Portanto essa

proporção pode ser modulada conforme a disponibilidade hídrica do solo. Como a expansão foliar é a primeira ser afetada, uma fatia maior de fotoassimilados se desloca para raiz, sustentando seu crescimento (PIMENTEL, 2004), sendo a segunda linha de defesa da planta. É importante destacar que a fotossíntese não é sensível ao déficit hídrico moderado tanto quanto a expansão foliar. Em muitas culturas, a fotossíntese se mantém mais elevada do que o crescimento expansivo foliar durante o início do déficit hídrico (HSIAO, 1973).

A terceira linha de defesa da planta é o fechamento estomático, que pode ser de duas formas. O fechamento estomático hidropassivo que acontece quando as células-guarda perdem rapidamente água para o ar de baixa umidade, não havendo tempo das células adjacentes suprirem esta necessidade de água e consequentemente ocorre o fechamento estomático (TAIZ; ZEIGER, 2004). O fechamento estomático hidroativo, a qual ocorre quando folhas e raízes encontram-se em estado de desidratação, e dependem de processos metabólicos nas células-guarda, ao qual o ABA está envolvido, através da produção de H_2O_2 e ativação de canais de cálcio (Ca^{2+}) (PEI et al., 2000).

Em déficit hídrico moderado e de curta duração os mecanismos de defesas descritos acima podem ser eficientes (KRAMER; BOYER, 1995), porém o fechamento estomático bloqueia o influxo de CO_2, causando colapso da cadeia transportadora de elétrons, com redução do transporte de elétrons, danos ao fotossistema II, diminuição da fotofosforilação e da síntese de adenosina trifosfato (ATP), limitando a capacidade de regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) (FLEXAS; MEDRANO, 2002; PIMENTEL, 2004). Para Farrant e Moore, 2011 a inibição da fotossíntese não é apenas consequência do estresse, mas sim estratégia de defesa da planta a fim de minimizar a produção excessiva de EAOs sempre observada durante a deficiência hídrica. Isso reflete na redução do acúmulo de fotoassimilados, implicando na diminuição da produtividade da cultura (YORDANOV et al., 2003).

Conforme o déficit hídrico torna-se severo as plantas partem para outra estratégia de defesa, o ajuste osmótico, na qual concentram solutos nas células para que o potencial hídrico seja diminuído. Deste modo a planta pela diferença de potencial hídrico entre solo e raiz, pode absorver a água que está adsorvida nas partículas do solo (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os solutos ditos compatíveis como prolina, alcoóis de açúcar (maniol, sorbitol), compostos quartenários de amônio (glicina betaína, β-alanina betaína, prolina betaína) e ácidos orgânicos (CIA, 2010), são nomeados desta forma, por não interferirem no metabolismo da célula e por isso são encontrados no citosol. Já os íons inorgânicos que também são usados no ajuste osmótico, encontram-se em vacúolos, pois em altas concentrações inibem algumas enzimas do citosol

(TAIZ; ZEIGER, 2004). Esta estratégia é necessária para planta, pois, o estado hídrico da célula, no caso sua hidratação, é muito importante durante o seu desenvolvimento (SALES, 2011).

Para Venkataramana, Rao e Naidu (1986) dentre os estresses ambientais o déficit hídrico é o fator mais importante por ser limitante na produção de cana-de-açúcar em todo o mundo. Portanto a detecção de marcadores não destrutivos morfológicos (altura e número de colmos) e fisiológicos (condutância estomática, eficiência do fotossistema II e taxa fotossintética) para tolerância ao déficit hídrico durante o crescimento é importante para o manejo da irrigação (SILVA et al., 2008; ZHAO; GLAZ; COMSTOCK, 2010). Bates et al. (1973), Gonzalez, Martin e Ayerbe (2008), Silva et al. (2007) e Almeida et al. (2013) indicaram que o conteúdo relativo de água na folha e o teor de prolina podem ser indicadores de déficit hídrico em plantas.

2.3 Prolina

A prolina é um aminoácido encontrado em plantas e animais. Em plantas sua principal função é osmoprotetora. Contém uma porção imino (C=NH), um grupo funcional carboxil (-COOH) e um grupo imino (-NH2) secundário.

A via de síntese da prolina pode ser proveniente do glutamato ou da arginina/ornitina. Quando parte do glutamato, este é catalisado a glutamato-semialdeido (GSA) pela Δ1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), e convertido espontaneamente a pirrolina-5-carboxilato (P5C) e então reduzido para prolina por P5C redutase (P5CR). A enzima P5CR é regulada por feedback de prolina. Quando provém da arginina, esta é convertida em ornitina pela enzima arginase. A via que leva o produto desta reação a se tornar prolina ainda não esta bem explicada em plantas (KISHOR et al., 2005). As duas formas de síntese são importantes, mas em condições de déficit hídrico a via do glutamato é favorecida (SODEK, 2004; BARTELS; SUNKAR, 2005). A síntese de prolina nos períodos de déficit hídrico é aumentada, mas sua degradação também é diminuída (STEWART et al., 1977). Porém, esta relação depende do tipo e da idade da planta (KISHOR et al., 1995; YAMADA et al 2005).

Kishor (2005) mostra que a prolina é dos osmólitos compatíveis o único soluto que realiza mais funções, como proteger as células contra danos induzidos pelo oxigênio singleto e por radicais livres. Isto se dá devido à capacidade da prolina de ligar-se ao radical superóxido ($-O_2^{\bullet}$), através de seu anel pirrolina. Ela também elimina o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$)

e ainda é capaz de estabilizar proteínas, DNA e membranas, além de ser uma fonte de energia alternativa, pois produz 30 ATPs.

A concentração de prolina, durante o déficit hídrico, disponibiliza o NAD^+ e $NADP^+$ envolvidos nos processos respiratórios e fotossintéticos, respectivamente. A síntese de prolina gera $NADP^+$, sua degradação produz NADPH. Portanto, a reciclagem da prolina é essencial para manter o potencial redox no citosol e nos plastídeos (VERMA, 1999).

Usar a prolina como marcador de que a planta está passando por déficit hídrico ou estresse salino não é totalmente confiável, pois situações de estresses podem se sobrepor e muitas alterações estão ocorrendo nas plantas, e o acúmulo de prolina muda entre variedades adaptadas a certas condições ambientais, assim como em plantas tolerantes à seca ou à salinidade, e que esse acúmulo está sujeito a permanência do déficit hídrico e da quantidade dos sais (HEUER et al.,1994). Porém, em situações controladas, como em experimentos em casa de vegetação, a prolina é usada como indicador de seca, um exemplo seria o trabalho de Rai et al. (2012) que mostram plantas de tomate transformadas com o gene *ZAT12* com maior resistências ao estresse hídrico e aumento considerável na produção de prolina. Rhein, et al. (2011) apontam aumento nos teores de prolina livre conforme aumento das deficiência hídrica no solo, afirmando que a prolina tem função osmoprotetora em células radiculares de cana-de-açúcar.

2.4 Morte celular programada

A MCP é um processo organizado e importante, pois mantém a homeostase celular. É um processo conservado em eucariotos (LAM, 2004; LAM, 2008). Possui uma função importante na defesa e desenvolvimento de organismos, pois pode remover células mutantes, danificadas ou infectadas dos tecidos saudáveis, isso em animais e plantas (ROGERS, 2006; SANMARTIN et al., 2005). Senescência e embriogênese são exemplos de eventos que envolvem este mecanismo (DANIAL; KORSMEYER 2004). É um processo com características morfológicas e bioquímicas distintas que englobam vias de sinalização controlando a morte das células sem que haja efeitos nocivos às células adjacentes (PALLAVAN-UNSAL; BUYUKYTUNCER; TUFEKCI, 2005).

Em animais a MCP é bem estudada, em especial em mamíferos. Nas plantas, o que sabemos de MCP é pouco, quando falamos em termos de mecanismos moleculares o nosso conhecimento atual baseia-se em grande parte em comparações com sistemas animais (ISHIKAWA, 2011).

Existem três tipos de MCP bem conhecidas em animais com base nas características morfológicas (ELMORE, 2007; KROEMER et al, 2009): a apoptose (Figura 3), necrose (Figura 3) e autofagia.

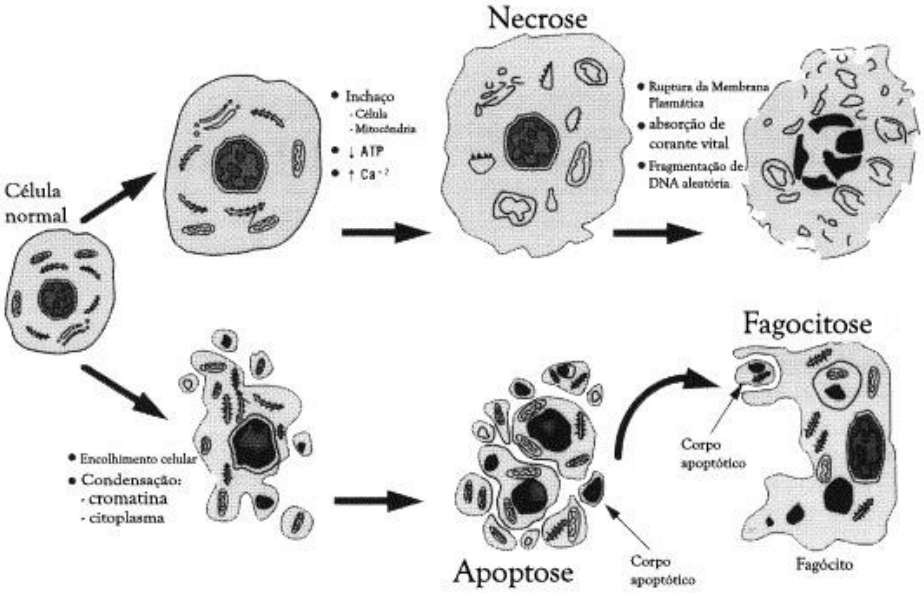


Figura 3- Diferenciação citomorfológica da necrose e apoptose em animais (retirada de Feuerstein et al., 1997, com modificações).

A apoptose é distinguida por ter condensação da cromatina, fragmentação nuclear e a formação de corpos apoptóticos. Estes corpos são então fagocitados por fagócitos que através de enzimas lisossomais degradam este corpo. Isto se faz necessário para que não haja extravasamento do conteúdo celular, o que levaria a um processo de inflamação (VAN DOORN et al. 2011). Necrose é caracterizada pela presença de inchaço na célula, devido à perda de capacidade de seletividade da membrana plasmática, havendo grande fluxo de íons e solutos pela membrana, com posterior entrada de água e sua ruptura. Os dois tipos apresentam uma reorganização do núcleo, com condensação de cromatina e fragmentação do DNA (SAMEJIMA; EARNSHAW, 2005). A autofagia ocorre geralmente na ausência de condensação de cromatina e é um processo de auto-digestão das células, em que os componentes celulares são engolidos em vesículas, chamadas autofagossomas, antes da sua degradação por lisossomas (DOMÍNGUEZ; CEJUDO, 2012).

MCP é um fator muito importante em plantas não só para o homeostase do organismo, como na interação planta-patógeno (HOFIUS et al, 2009). Em plantas a MCP afeta certos tipos de células em fases específicas do desenvolvimento e pode ser caracterizada por ruptura

do tonoplasto vacuolar, liberação de hidrolases, que em alguns casos atacam todo o conteúdo celular com possível quebra da parede celular (DOMÍNGUEZ; CEJUDO, 2012).

Para Van Doorn et al. (2011) não podemos classificar morte celular programada de plantas em apoptose, pelo fato de células vegetais possuírem parede celular que impedem a formação de corpos apoptóticos e ausência de células fagocíticas. Domínguez e Cejudo (2012) mostram em seu trabalho que o núcleo é o principal afetado na apoptose animal, e para eles o desmantelamento nuclear é ponto em comum na MCP de animais e plantas.

Van Doorn et al. (2011) reconhecem em seu trabalho duas classes principais de morte celular que ocorre na biologia das plantas: a morte celular vacuolar e a morte celular por necrose (Figura 4). A morte célula vacuolar caracteriza-se pela diminuição do conteúdo citoplasmático e o aumento do vacúolo. Ocorre invaginações do tonoplasto e fusão das vesículas com o vacúolo, seguido por absorção e degradação de porções do citoplasma no lúmen vacuolar. E a finalização deste processo é a ruptura do tonoplasto com liberação de hidrolases vacuolares que irão degradar todo o protoplasto podendo chegar à totalidade da célula e até, em alguns casos, a parede celular. A morte celular por necrose é despertada por uma variedade de estresses abióticos e pela interação planta-patógeno durante a resposta de hipersensibilidade (HR) e por patógenos necrófitos. Suas características citológicas são inchaço mitocondrial, ausências de grandes vacúolos e precoce ruptura da membrana plasmática levando a uma diminuição do volume do protoplasma, porém, sem grandes modificações estruturais, pois não há digestão das estruturas internas da célula vegetal por enzimas do vacúolo como na morte celular vacuolar. Porém Van Doorn et al. (2011) alertam que algumas mortes celulares causada por HR possuem características distintas das descritas acima necessitando de classificação especial.

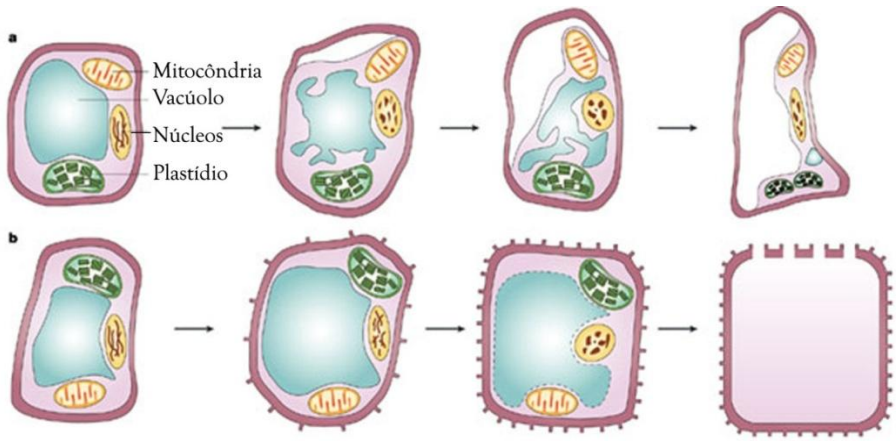


Figura 4- Esquema de morte em células vegetais. a) morte celular vacuolar; b) morte celular por necrose (retirada de LAM, 2004, com modificações)

Lacomme e Santa Cruz (1999) e Dickman et al. (2001) mostram uma supressão ou indução na MCP de plantas transgênicas que continham os fatores reguladores apoptóticos de animais (Bcl-2 e Bax). Plantas transgênicas expressando *Bax* de mamíferos têm morte celular acompanhada da geração de EAOs (YOSHINAGA et al., 2005). Além disso, a expressão de proteínas supressoras relacionadas à família Bcl-2, anti-MCP, reprime a expressão da proteína Bax e a morte celular induzida por estresse oxidativo em plantas (CHAE et al., 2003). No entanto deve haver um mecanismo de morte celular altamente conservado em eucariotos que antecede a separação de plantas e animais, como a liberação de citocromo c pelas mitocôndrias e ativação de proteases de DNAses e caspases (ISHIKAWA, 2011). Apesar destas características em comum, o sequenciamento do genoma de espécies vegetais não revelou a presença de reguladores centrais da MCP observada em animais, incluindo a presença de proteínas Bcl-2 (HOEBERICHTS; WOLTERING, 2003; LAM, 2004). No entanto, estes dados sugerem que a MCP em plantas é controlada por um grupo distinto de reguladores que desempenham funções semelhantes aos reguladores da MCP em animais.

2.5 Espécies ativas de oxigênio e estresse oxidativo

O oxigênio (O_2) devido à estabilidade dos seus elétrons não é reativo e nem tóxico. Mas os desarranjos desses elétrons externos podem formar algumas novas espécies, como o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^-) e o oxigênio singleto ($^1O_2$). São os que chamamos de elementos ativos de oxigênio (EAOs), que como o nome já diz, são ativos, por não precisarem de entrada de energia para reagir com outras moléculas (RESENDE et al., 2003).

O superóxido oxida o ascorbato e reduz o Fe^{+3}. Sua formação advém de transferências de elétrons entre cloroplasto e mitocôndria, além de ativações de lípogenenases, peroxidases, e NADPH/oxidase/sintase (BREUSEGEM et al., 2001) . O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado pela dismutação do O_2^-, catalisada pela superóxido dismutase, devido à ausência de carga é estável e de fácil passagem pela membrana celular (APOSTOL; HEINSTEIN; LOW, 1989). O radical hidroxila possui afinidade por biomoléculas (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1989). O oxigênio singleto também reage com biomoléculas e tem alto poder de causar danos, principalmente perto dos locais de sua produção (FOYER et al., 1994). Em geral, são extremamente citotóxicas para todos os organismos, capazes de produzir modificações químicas e danos em proteínas, lipídeos, carboidratos e nucleotídeos (ESTEVES; SUZUKI, 2008; SCANDALIOS, 2005).

A fotossíntese e respiração podem produzir EAOs normalmente sem que danos sejam causados ao organismo, pois sua concentração é mantida baixa pelo sistema antioxidante (GRATÃO et al., 2005). EAOs também são moléculas sinalizadoras dentro da planta, participam de ativação de genes de resposta ao estresse e defesa. Porém os processos metabólicos das organelas vegetais são muito sensíveis a mudanças ambientais, como por exemplo, o déficit hídrico. Isto pode gerar desequilíbrio no metabolismo da planta, havendo produção de EAOs maior do que a capacidade do sistema antioxidante, ocasionando estresse oxidativo (SUZUKI et al., 2012).

Estresse oxidativo ocorre em períodos de déficit hídrico devido a decréscimo da fotossíntese que é bloqueada pela baixa quantidade de luz absorvida, que gera baixa excitação nos elétrons e conseqüentemente baixa energia disponível para o processo (FOYER; NOCTOR, 2000). E o estresse oxidativo causa destruição da membrana celular, pela quebra dos lipídios nela presente, inativação enzimática e estragos ao DNA e RNA e, em casos extremos, MCP (CIA, 2010).

Os organismos aeróbicos desenvolveram mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos para proteger suas células dos efeitos tóxicos da oxidação. O mecanismo antioxidante não enzimático inclui composto como ascorbato (Aas), glutationa (GSH), flavonóides, alcalóides, compostos fenólicos, tocoferol e carotenóides (APEL; HIRT, 2004; MITTLER, 2002). O Aas e o GSH podem eliminar OH^- e O_2^- diretamente (NOCTOR; FOYER, 1998). O mecanismo antioxidante enzimático inclui algumas enzimas específicas que serão descritas adiante.

Desta maneira, o balanço intracelular dos sistemas oxidantes e antioxidantes é vital para o bom desempenho das funções celulares, para a sua regulação, bem como para a aclimatação à diferentes condições de crescimento.

2.6 Sistema antioxidante

O sistema antioxidante é fundamental para a proteção do aparato fotossintético da destruição oxidativa. O aumento na atividade dessas enzimas é forte indicador do controle do estresse oxidativo nas plantas e consequentemente da regulação negativa da morte celular programada (MCP) (REDDY et al., 2004). Entretanto, quando o estímulo para a produção de EAOs é maior do que a capacidade antioxidante da célula, como no caso de déficit hídrico prolongado, o metabolismo vegetal é afetado seriamente, desencadeando disfunções fisiológicas, podendo acarretar em MCP.

Gressel e Galun (1994) apontam relação entre o aumento das enzimas antioxidantes e o nível de tolerância da planta em questão ao déficit hídrico. Os passos da planta durante sua defesa ao estresse seria primeiro evitar que EAOs se formassem, porém se formados, o segundo passo seria eliminá-los, mas se danos causados por EAOs não fossem evitados, o terceiro passo seria então minimizar os danos através do seu reparo (MOLLER, 2001; NOCTOR; FOYER, 1998).

As enzimas antioxidantes têm a função de eliminar as EAOs (MEDICI et al., 2004). A ativação de enzimas como ascorbato peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase, superóxido dimutase, polifenoloxidase e glutationa redutase leva a proteção enzimática celular e dos compartimentos sub-celulares (REDDY et al., 2004). Porém outros compostos não enzimáticos também podem ajudar a planta contra o estresse oxidativo, como flavonóides, ascorbato, tocoferol, alcalóides, ácido ascórbico, carotenóides e poliaminas (LAWLOR; CORNIC, 2002). Kumar et al. (2013) mostraram que plantas transgênicas de *Brassica juncea*, que superexpressavam o gene gammatocopherol metil transferase (*γ-TMT*), a qual aumenta a produção de α-tocoferol, tinham mais resistência ao estresse osmótico. Sales (2011) coloca o sistema enzimático antioxidante como a principal causa de resistência ao déficit hídrico em variedades de cana-de-açúcar IACSP 97-7065 e IACSP 94-2094.

2.6.1 Catalase (CAT)

CAT é uma enzima tetramérica Fe-porfirina (CIA, 2010), é responsável por converter o H_2O_2 que resulta da reação de transformação do glicolato a glioxilato durante a fotorrespiração (IGAMBERDIEV; LEA, 2002) ou a β-oxidação de ácidos graxos (HOLTMAN et al., 1994) sem consumir agentes redutores celulares. Porém é necessário que duas EAOs se liguem a CAT, pois esta enzima tem baixa afinidade a H_2O_2 para haver a reação com apenas uma molécula. Conclui-se então que a CAT é responsável por eliminar o excesso de EAOs durante o estresse (GRATÃO et al., 2005). A CAT está presente nos peroxissomos e converte H_2O_2 em O_2 sem a participação de nenhuma molécula, ao contrário da ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase que envolvem doadores de elétrons em seus ciclos (MITTLER, 2002). Hu et al. (2013) estudaram um transgênico de tabaco, com o gene *TaASR1* de trigo que sabia-se ter resistência a seca. As plantas de tabaco transgênicas tiveram melhor resistência ao déficit hídrico do que as plantas selvagens. Foi constatada maior concentração de CAT nas plantas transformadas. Patade et al. (2012) analisaram quais genes seriam responsivos ao estresse salino em folhas de cana-de-açúcar e notaram grande expressão do gene *CAT2*, que codifica a enzima catalase.

2.6.2 Ascorbato peroxidase (APX)

A APX é uma heme peroxidase. Suas isoformas podem ser encontradas no estroma, onde localizam-se na membrana do tilacóide, presas as membranas do peroxissomos e glioxissomos, no citosol está ligada a membrana mitocondrial (SHIGEOKA et al., 2002). Por possuir grande afinidade por H_2O_2, é responsável por um mecanismo mais preciso da resposta aos EAOs (MITTLER, 2002), também por estar presente em mais lugares que a CAT. A APX reduz o H_2O_2 à água utilizando o ascorbato como doador de elétrons. Bhatt et al. (2012) estudaram plantas de *Eleusine coracana* (um tipo de cereal) sob déficit hídrico e concluiu que a APX tem forte relação com tolerância ao déficit e diz que isoformas clonadas de ascorbato peroxidase podem ser utilizadas para o desenvolvimento de genótipos tolerantes via transformação genética. Kausar et al. (2012) também mostraram uma relação entre aumento de APX e déficit hídrico, no caso em soja. Wang et al. (2012) avaliaram dois tipos de porta enxerto em maçã, um era tido como resistente e outro tolerante a seca, conclui-se que o porta enxerto resistente tinha níveis elevados de APX durante a indução de déficit hídrico.

2.6.3 Guaiacol Peroxidase (GPOX)

Esta enzima também usa outras moléculas como doadoras de elétrons, no caso guaiacol ou pirogalol, porém sua principal função não é neutralizar o EAOs presentes na célula, o GPOX usa o H_2O_2 para produzir oxidados que serão utilizados pelas células em seus processos metabólitos (ASADA, 1999). É utilizado também na degradação do ácido indol acético (AIA), formação de lignina e defesa contra patógenos (GRATÃO et al, 2005). Ahmed (2013) comparou genótipos diferentes de cevada e concluiu que a resistência a seca está relacionada com o aumento do sistema antioxidante, na qual a GPOX faz parte.

2.7 Família de proteínas Bcl-2 e sua relação com apoptose dependente de mitocôndria e estresse no retículo endoplasmático.

A família das proteínas B-cell lymphoma (Bcl-2) foram descobertas em linfoma folicular de células β. O gene *bcl- 2* foi descoberto em uma translocação entre o cromossoma 14 e 18 (BONNEAU et al., 2013) e isto aumentou a expressão da proteína Bcl-2 que atua na inibição da morte celular (TSUJIMOTO et al., 1985), diferente dos demais oncogenes descritos que ativam a proliferação celular (VAUX; CORY; ADAMS, 1988).

Nos vertebrados foram identificados 15 membros da família de proteínas Bcl-2. Estas são proteínas globulares que contém α-hélices (BONNEAU et al., 2013), ao nível molecular, divididos em três sub-famílias que regulam a apoptose em animais: sub-família Bcl-2,

proteínas que agem inibindo a MCP (Bcl-2, Bcl-w, A1, Mcl-1 e Bcl-XL) e duas sub-famílias de proteínas que agem ativando a MCP, a Bax (Bax, Bak e BoK) e a BH3 (Bad, Bid, Bik, Blk, Hrk, BNIP3 e BimL) (WATANABE; LAM, 2009).

Para Andersen e Kornbluth (2013) as mitocôndrias são importantes na via sinalização apoptótica, sendo que todos os estímulos de morte celular convergem para a mitocôndria com posterior liberação do citocromo c no espaço intracelular. A liberação do citocromo c é um momento crucial na apoptose (LLAMBI et al., 2011) e isto ocorre devido a um fenômeno chamado de permeabilização da membrana mitocondrial externa, com ativação de membros da família Bcl- 2 (Bax e Bak) na superfície externa da membrana. Bax e Bak atuam como formadoras de poros na membrana externa da mitocôndria liberando citocromo c e outras proteínas (BASAÑEZ; SOANE, HARDWICK, 2012) no citosol, desencadeando a ligação de fatores de ativação apoptóticos de proteases (Apaf-1) a caspases, que por fim, quebram vários substratos celulares até a completa desintegração da célula e a formação do corpos apoptóticos característicos da apoptose (ANDERSEN; KORNBLUTH, 2013) (Figura 5). Este processo é controlado negativamente por proteínas do tipo de Bcl-2, anti-apoptóticas, tais como Bcl-2 e Bcl-XL, que podem inibir a ativação de Bax através da sua interação direta (ISHIKAWA, 2011).

Foram encontrados representantes das três subclasses da família Bcl-2 no retículo endoplasmático (RE) com função de regular as vias apoptóticas em resposta a uma gama de tensões celulares. Szegezdi et al. (2006) apontam o RE como ponto inicial para regulação das vias dependentes da mitocôndria que levam a apoptose. O RE é uma organela muito importante em eucariotos, é a primeira da via secretora (COSTA, 2007), é no ER que ocorre a síntese, a dobra e a modificação de proteínas, além de armazenamento de Ca^{2+} (BONNEAU et al., 2013). O rápido influxo de polipeptídios mal dobrados excede a capacidade de dobramento do RE, e junto com a dificuldade deste em dobrar corretamente as proteínas devido falhas nos níveis necessários de Ca^{2+} e erro na estrutura primária da proteína, levam esta organela ao estresse (COSTA , 2007).

Esse estresse tem três principais respostas na célula: (1) as proteínas deformadas podem ser degradadas pelo sistema ubiquitina-proteossoma; (2) ativação da via de resposta as proteínas mal dobradas do RE (UPR), que ativam genes que regulam a homeostase do RE aumentando a capacidade de dobramento de proteínas e diminuindo a demanda por estes dobramentos (COSTA, 2007); (3) ativação da apoptose, caso os mecanismos anteriores forem insuficientes e prolongados (SZEGEZDI et al., 2009) (Figura 6). Esta última resposta ocorre através da inibição de Bcl-2 e ativação BH3, que irá causar a liberação de Ca^{2+} do RE para o

citosol (ORRENIUS et al., 2003). O elevado nível de Ca^{2+} no citosol por sua vez ativará Bax e Bak, que promovem a liberação do citocromo c das mitocôndrias, polarização e permeabilização da mesma, formação de EAOs e perda de ATP e desencadeará a apoptose dependente da mitocôndria como foi descrito acima (HENKE et al., 2011).

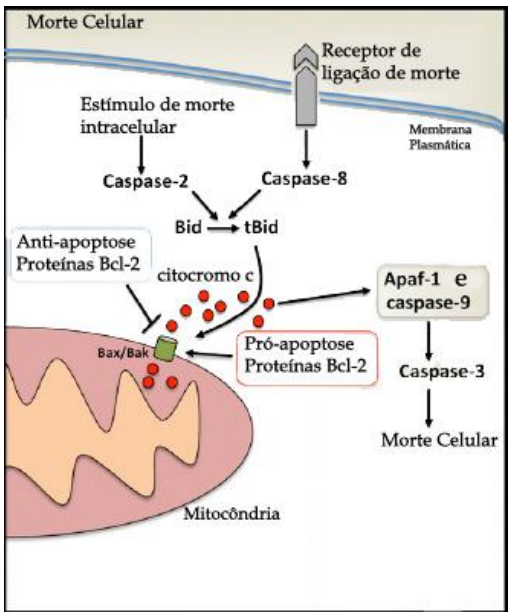


Figura 5- Esquema das principais etapas da morte celular disparada na mitocôndria (retirado de Andersen e Kornbluth (2013) com modificações).

Membros da família de proteínas Bcl-2 não são encontrados em plantas, mas um homólogo do gene *Bax inibidor-1 (BI-1)* de animais, foi isolado e identificado em plantas de *Arabidopsis thaliana*, o *AtBI-1* . Inibidor Bax- 1 é uma proteína reguladora negativa da morte celular mediada por Bax e H_2O_2 em plantas, leveduras e animais (CHAE et al., 2003; KAWAI-YAMADA et al., 2001).

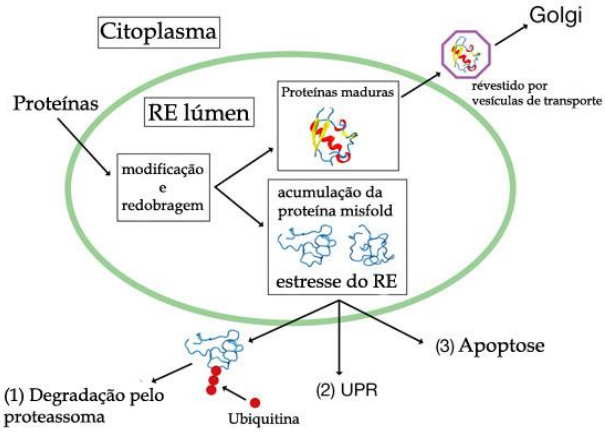


Figura 6- Esquema do mecanismo de estresse no retículo (RE) (retirado de http://www.pdbj.org/eprots/index_en.cgi?PDB%3A2RIO , com modificações. Visita em 04 de março de 2013).

2.8 O gene BI-1 e seu homólogo *AtBI-1*

A proteína anti-apoptótica, BI-1 (Bax Inibidor 1) foi capaz de combater a MCP induzida em leveduras pela ação de Bax de mamíferos. Seu desempenho citoprotetor foi descoberto em bibliotecas de cDNA de humanos (MELOTTO-PASSARIN, 2009; XU; REED, 1998)

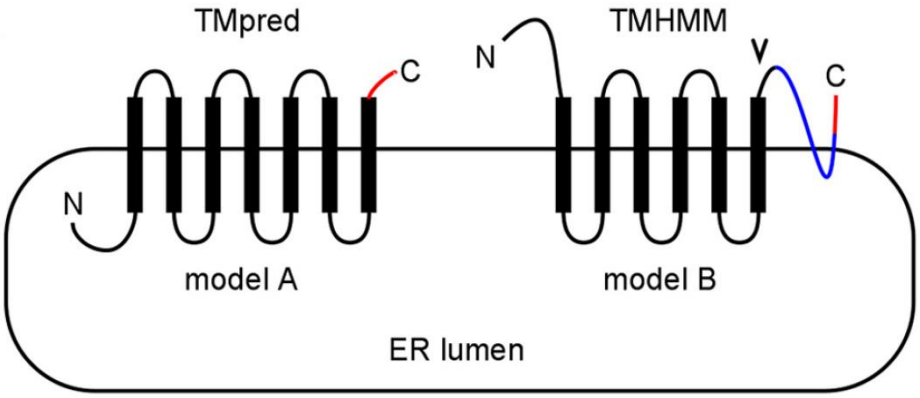


Figura 7- Modelo A proposto por TMpred, modelo B proposto por TMHMM (retirado de Bultynck et al., 2012).

Bultynck et al. (2012) tentaram formular um modelo para proteína BI-1 para entender melhor a relação desta na regulação de Ca^{2+}, e fez então um esquema de BI-1 com sua cauda hidrofóbica e seus seis domínios transmembranares presentes no RE e um domínio C-terminal voltado para o citosol, a diferença está em que em um modelo o domínio C-terminal tem uma alça transmembranar, na qual o autor propõem uma homologia a canais de sódio voltagem-dependentes (Figura 7).

Gene *BI-1* de plantas, assim como de animais, é expresso em diversos tecidos (folha, raiz, caule, flores, frutas, etc) e seu nível de expressão aumenta durante a senescência e sob condições de estresse, sugerindo que a função de BI-1 é fisiologicamente associada ao controle de morte celular, de estresses bióticos e abiótico (ISBAT et al., 2009; WATANABE, LAM, 2006) e apoptose induzida por estresse no ER (XU; REED, 1998).

Chae et al. (2004) mostraram em seu trabalho que a proteína BI-1 bloqueia a via de apoptose deflagrada por estresse no RE em células *in vitro* de mamíferos e em ratos *in vivo*. O mecanismo que BI-1 tem de proteção é caracterizado pela supressão da ativação de Bax impedindo que o sinal chegue à mitocôndria bloqueando então a liberação de caspases. Portanto concluiu-se que BI-1 não permite que o sinal de morte conecte-se a mitocôndria.

Kawai-Yamada, Ohori e Uchimiya (2004) analisaram plantas transgênicas de tabaco expressando o gene *AtBI-1* de *Arabidopsis thaliana* e o gene *Bax* de ratos. Os resultados

indicaram que *AtBI-1* não influencia no acúmulo de EAOs gerado pelo gene *Bax*, confirmando o relatado por Baek et al. (2004).

Kawai-Yamada, Ohori e Uchimiya (2004) também demonstraram que a região do C-terminal é necessária para a inibição da morte celular em leveduras induzida por *Bax*. Células transgênicas de leveduras sem 14 resíduos de aminoácidos no C-terminais de *AtBI-1* aboliram completamente a capacidade da célula de suprimir a apoptose. Por outro lado, células transgênicas de arroz em que os 31 aminoácidos C-terminais de *AtBI-1* foram eliminados, a capacidade de inibir a morte celular não foi alterada. Quando os aminoácidos pretendidos para formar a estrutura em espiral enrolada na região C-terminal foram substituídos por outros aminoácidos, tais construções mutantes não conseguiram inibir a morte celular induzida por Bax. Kawai-Yamada, Ohori e Uchimiya (2004) concluíram que a região em espiral do domínio C-terminal (Figura 7) é essencial para evitar os efeitos prejudiciais de EAOs e que esse domínio é comum a animais e vegetais.

Bultynck et al. (2012) afirmam em seu trabalho que a porção C-terminal, no sétimo domínio, de BI-1 humano lembra um poro e funciona como um canal que regula os níveis de Ca^{+2} durante o estresse no RE e complementa que a superexpressão de BI-1 sem a cauda não interrompe a morte celular, reforçando as conclusões de Kawai-Yamada, Ohori e Uchimiya (2004).

Ihara-Ohori (2007) mostraram em seu estudo que a porção C-terminal *AtBI-1* interage com a proteína AtCaM7, uma calmodolina, e que mutantes que perdiam esta possibilidade de ligação não inibiam a morte celular induzida por Bax, apoiando a conclusão de que a supressão de morte celular por *AtBI-1* envolve a translocação de Ca^{2+} no RE ou Golgi.

Em plantas estas relações entre *AtBI-1* e controle nos níveis de Ca^{2+} durante o estresses biótico, abiótico e no RE não estão bem elucidadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e as análises foram realizados no laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), Departamento de Ciências Biológicas - ESALQ/USP em Piracicaba-SP.

3.1 Material Vegetal

Foram utilizadas plantas micropropagadas da variedade de cana-de-açúcar RB835089 não transformadas, e plantas transgênicas originadas desta mesma variedade expressando o cDNA do gene *AtBI-1* isolado de *Arabidopsis thaliana* por Sanchez, Torres Zebala e Grant (2000). As plantas transgênicas foram obtidas por Melotto-Passarin (2009), no Centro de Biotecnologia Agrícola – CEBTEC/ ESALQ-USP.

A transformação genética foi realizada pela co-transformação do gene *neo*, que codifica para neomicina fosfotransferase (NPTII), e confere resistência ao antibiótico geneticina, presente no plasmídeo pHA9 (promotor *Ubi-1*, gene neo, terminador-Nos) (BOWER; BIRCH, 1992; FICHT; DE LA CRUZ; MOORE, 1995) e os plasmídeos pDM8 (promotor *CaMV35S*, *AtBI-1*-V5His6, terminador-Nos) (Figura 8) e pDM9 (promotor *Ubi-1*, *AtBI-1* -V5His6, terminador-Nos) (Figura 9). O gene *AtBI-1* foi cedido pelo Dr. Eric Lam da Rutgers University, no plasmídeo pNW166. Estes vetores foram desenvolvidos por Melotto-Passarin (2009).

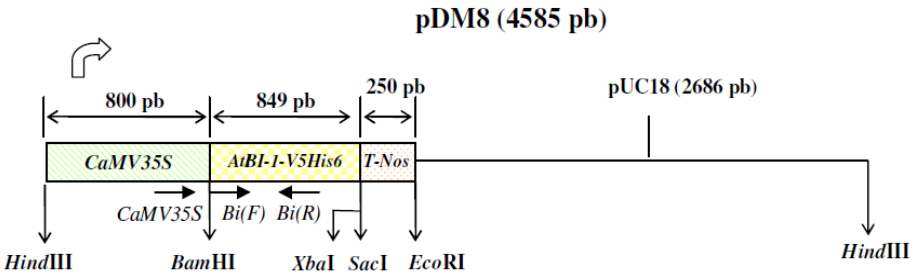


Figura 8- Esquema do vetor pMD8 com 4585pb que contém o cassete de expressão do cDNA do gene *AtBI-1* sob controle do promotor 35S (retirado de MELOTTO-PASSARIN, 2009).

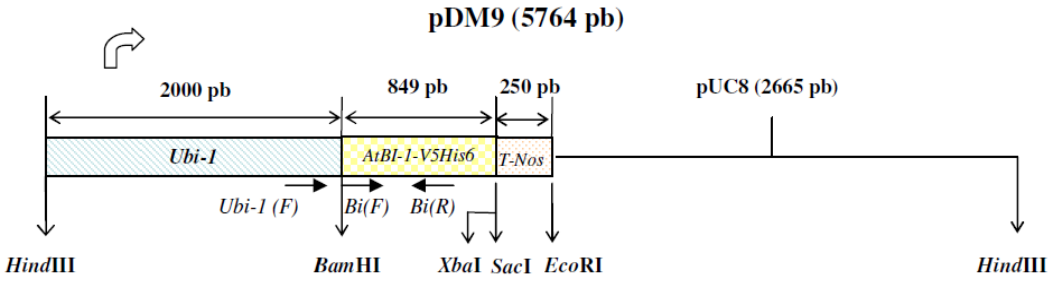


Figura 9- Esquema do vetor pMD9 com 5764pb que contém o cassete de expressão do cDNA do gene *AtBI-1* sob controle do promotor Ubi-1 de milho (retirado de MELOTTO-PASSARIN, 2009).

De acordo com Melotto-Passarin (2009) a extração do DNA total e análises de reação em cadeia polimerase (PCR) confirmaram a presença do cDNA de *AtBI-1* e/ou do transgene *neo* em cinco eventos de transformação de plantas. A planta obtida com os plasmídeos pHA9 + pDM8 foi designada de P1, as plantas obtidas com os plasmídeos pHA9 + pDM9 foram designadas de P15, P16 e P21. Apesar das plantas P19 terem sido bombardeadas com os plasmídeos pHA9 + pDM9 elas possuem apenas a presença do transgene *neo* (pHA9). A técnica de reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) foi usada para revelar o nível de expressão do gene *AtBI-1* nestas plantas. Em todas as reações de qPCR foram utilizados como controles o DNA das plantas: tabaco não transformada – tipo selvagem (controle negativo) e de *Arabidopsis thaliana* (controle positivo) (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de expressão do gene *AtBI-1* em plantas de cana-de-açúcar transformadas geneticamente.

Identificação	Construções	DNA genômico	Nível de expressão
P1	pHA9 + pDM8	positivo	+++
P15	pHA9 + pDM9	positivo	++
P16	pHA9 + pDM9	positivo	++
P21	pHA9 + pDM9	positivo	+++
P19	pHA9	negativo	n.e
Tipo selvagem 1	--	negativo	n.e
Tipo selvagem 2	--	negativo	n.e
A. thaliana	--	positivo	+++

(+++) fortemente expresso; (++) expresso; (n.e.) não expresso

Estas plantas transgênicas P1, P15, P16 e P21, mais as plantas controles, plantas da cultivar RB835089 não transformadas que chamaremos de CONTROLE (WT) e as plantas P19 contendo o gene *neo* que chamaremos de Vetor Controle (VC), foram transplantados para a casa de vegetação para posteriores estudos de déficit hídrico.

3.2 Aclimatação das plantas em casa de vegetação

Plantas provenientes de cultivo *in vitro*, mantidas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), foram retiradas dos frascos, lavadas com água corrente para retirar o excesso do meio de cultura e, em seguida, foram aclimatadas em casa de vegetação em vasos contendo substrato comercial Plantmax®. A casa de vegetação possui sistema de irrigação por gotejamento nos vasos, temperatura controlada a 26 ± 2°C, com manutenção da umidade relativa por meio de microaspersão.

As plantas foram utilizadas em um experimento com inoculação do fungo da ferrugem marrom *(Puccinia melanocephala),* e dois experimentos de déficit hídrico em casa de vegetação que serão detalhados adiante.

3.3 Inoculação da ferrugem marrom *(Puccinia melanocephala)*

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Fungos Fitopatogênicos, do departamento de fitopatologia e nematologia, da ESALQ- USP. Plantas em casa-de-vegetação de 60 dias, foram individualizadas e transplantadas para vasos contendo terra de barranco, húmus de minhoca e areia (proporção 1:1:1), e, após período de aclimatação de 30 dias, foram utilizadas para este ensaio. A inoculação de esporos de *Puccinia melanocephala* foi feita sobre plantas RB 835486, controle suscetível, RB805389 controle resistente (WT), P15, P19(VC). Foram utilizadas cinco plantas escolhidas ao acaso, como replicações.

O ensaio utilizou uma suspensão de esporos ($5,3 \times 10^4$ esp/mL H_2O) que foi aplicada sobre a face abaxial da folha +1 (Figura 10) de cada planta, sendo aplicado 3mL por planta. Após este procedimento as plantas foram colocadas em câmara úmida por 24h e depois mantidas por 12 dias em incubadora (21°C; 12 horas de fotoperíodo). Posteriormente foi avaliado número de pústulas por cm^2 com auxílio de um molde com duas janelas com $1cm^2$ cada. Para cada repetição foi considerado o valor médio das duas contagens.

3.4 Experimentos de Déficit Hídrico

Foram realizados dois experimentos de déficit hídrico em casa-de-vegetação em datas diferentes, um em janeiro e outro em setembro de 2012.

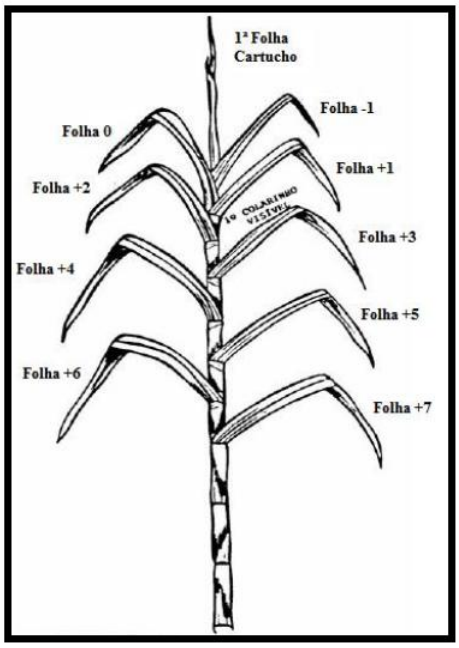


Figura 10- Numeração das folhas pelo sistema de Kuijper (VAN DILLEWIJN, 1952).

3.4.1 Experimento 1: imposição de déficit hídrico em plantas de 90 dias

Plantas aclimatadas em casa-de-vegetação por 60 dias, foram individualizadas, selecionadas pela similaridade de tamanho e características morfológicas e transplantadas para vasos de 10L contendo terra de barranco, húmus de minhoca e areia (proporção 1:1:1) e, após um período de aclimatação de 30 dias, foi montado o experimento. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6x2, formado pela combinação das plantas transformadas e não transformadas. A unidade experimental foi representada por um vaso contendo uma planta.

Este experimento foi realizado em janeiro de 2012. Utilizou-se plantas controles (WT) e P19(VC), e as plantas transgênicas P1, P15, P16 e P21 com 4 repetições cada. Antes da imposição dos tratamentos foram avaliados parâmetros morfológicos, nas plantas controle (WT) e P15, como: altura de planta, circunferência do colmo, índice de área foliar e densidade de estômatos e tricomas. Neste experimento houve implantação de dois tratamentos, controle (rega diária com 500 mL de H_2O destilada) e déficit hídrico (suspensão da rega), e ao longo deste foram analisadas as diferenças entre os tratamentos nas plantas transgênicas e controle nos determinados parâmetros: comportamento fotossintético e estomático e conteúdo relativo de água nas folhas.

Nos tempos 0, 10, 12, 14, 17, 19, 21 e 24 dias após a implantação dos tratamentos (DAT), entre as 10h e 14h foram feitas as análises do comportamento fotossintético e

estomático. As coletas das amostras para análise do conteúdo relativo de água foram feitas em 4, 11, 14, 18 e 21 DAT.

3.4.1.1 Metodologias usadas no experimento 1

3.4.1.1.1 Parâmetros morfológicos

- Altura de plantas (cm): foi medida do nível do solo até a última região auricular visível da folha +1, segundo o sistema Kuijper (Figura 10), descrito por Van Dillewinj (1952).

- Circunferência do colmo (cm): foi medido com o auxílio de um paquímetro digital em cm. As leituras foram feitas no centro do segundo entrenó localizado na base do colmo primário.

- Densidade de estômatos e tricomas: para a contagem de estômatos foi utilizada a técnica de modelagem com esmalte incolor (PERGORARO, 2007) no terço médio das folhas +3, na face abaxial (Figura 10). A densidade estomática foi determinada através da contagem de estômatos situada numa área de 1 mm^2. Em cada planta foram realizadas 30 contagens em microscópio invertido trinocular Leica modelo DM IL LED, em aumento de 200x. Foram contabilizados os tricomas presentes na lâmina foliar e nas nervuras principal e secundárias

3.4.1.1.2 Avaliação do comportamento estomático e fotossintético das plantas

As trocas gasosas foram avaliadas com um analisador de gases por infravermelho modelo LCpro$^+$ (ADC BioScientificLtd., Hertfordshire, UK), segundo instruções do equipamento. As variáveis estudadas foram: assimilação de CO_2 (CER, μmol m^{-2} s^{-1}) e condutância estomática (g_s, mol m^{-2} s^{-1}). As medidas foram realizadas na folha +1 (Figura 10), no terço médio do limbo foliar, com intensidade luminosa controlada artificialmente pelo LCpro$^+$ e mantida constante, i.e., Q = 1500 μmol m^{-2} s^{-1}. A concentração padrão de CO_2 do ar durante as avaliações foi mantida em 362 ±4 μmol mol^{-1}. Todas as quatro repetições do experimento foram avaliadas.

3.4.1.1.3 Avaliação do conteúdo relativo de água nas folhas

O conteúdo relativo de água nas folhas (RWC) foi determinado pelo método descrito por Barrs e Weatherley (1962). Amostras de 1 x 7 cm de folhas expandidas, não utilizadas para as medidas de trocas gasosas, foram cortadas com estilete na porção entre a nervura central e a borda da folha. Em seguida, as amostras foram pesadas (peso fresco - PF), hidratadas em água destilada durante 4 h, secas cuidadosamente em papel filtro, e pesadas novamente (peso túrgido - PT). Após a pesagem, os segmentos de folhas foram mantidos a

80°C por 24 h para a obtenção do peso seco (PS). O RWC foi determinado pela equação 2: RWC = [(PF-PS) / (PT-PS)] x 100 (2)

3.4.2 Experimento 2: imposição de déficit hídrico em plantas de 60 dias

Plantas aclimatadas em casa-de-vegetação por 30 dias, foram individualizadas e transplantadas para vasos de 10L contendo terra de barranco, húmus de minhoca e areia (proporção 1:1:1), e, após período de aclimatação de 30 dias, foi montado o experimento. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2, formado pela combinação das plantas transformadas e não transformadas. A unidade experimental foi representada por um vaso contendo uma planta.

Este experimento foi realizado em setembro de 2012, quando foi feita a implantação de dois tratamentos: controle (rega diária com 500 mL de H_2O destilada) e déficit hídrico (suspensão da rega). Foram usadas plantas controles (WT), e plantas transgênicas P15 com 4 repetições cada. A taxa fotossintética das plantas foi monitorada diariamente até chegar a níveis baixos na planta controle (WT), que levou 17 dias após a implantação dos tratamentos (DAT). Esta avaliação foi realizada diariamente entre as 10h e 14h. Após os 17 DAT foram coletadas amostras de folhas de todas as plantas para posteriores análises de prolina, proteína total solúvel, guaiacol peroxidase, ascorbato peroxidase e catalase. As amostras de folhas foram congeladas em N_2 líquido e armazenadas em frezeer a - 80 ºC.

3.4.2.1 Metodologias usadas no experimento 2

3.4.2.1.1 Quantificação Prolina

A quantificação de prolina nas amostras foi realizada segundo Bates (1973) com modificações. Foi usado 3 g de matéria fresca. Este material foi macerado com nitrogênio liquido até a obtenção de um pó fino, após este processo adicionou-se 3,0 mL de ácido sulfosalicílico a 3% (p/v). Em seguida a mistura foi centrifugada a 6000rpm à 15ºC por 30 minutos. Foram coletados 2mL do sobrenadante e adicionado 2 mL ninidrina ácida (1,25g ninidrina; 30mL ácido acético glacial; 20mL de ácido fosfórico 6M) e 2 mL de ácido acético glacial. As amostras foram deixadas em banho-maria seco a 100ºC durante uma hora. Após completo resfriamento das amostras, foram realizadas as leituras em absorbância medida a 520 nm no espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em µg de prolina/g de massa fresca.

3.4.2.1.2 Extração de proteínas totais

A extração de proteínas totais foi realizada segundo Azevedo et al. (1998). Foi usado 3g de matéria fresca. Este material foi macerado com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, após este processo adicionou-se o tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 (1mM EDTA, 3mM de DTT, 4% PVPP). A cada 1g de tecido usado na maceração adiciona-se 3mL de tampão. O homogeneizado foi centrifugado à 10.000rpm por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado, dividido em alíquotas e armazenado em freezer à - 80°C.

3.4.2.1.3 Quantificação proteínas totais

A determinação de proteína foi feita seguindo o protocolo proposto por Bradford (1976), utilizou-se o BSA (Bovine Serum Albumin) como padrão. O resultado foi expresso em mg/mL.

3.4.2.1.4 Atividade da Guaiacol Peroxidase (GPOX)

A determinação de GPOX foi feita seguindo o protocolo proposto por Matsuno e Uritani (1972). Foi usado tampão fosfato-citrato pH 5,0 (solução de fosfato dissódico dibásico 0,2M e ácido cítrico 0,1M), guaiacol 0,5%, H_2O_2 3% e metabissulfito de sódio 2% . Com estes reagentes foi feita uma solução A, contendo: 390µL tampão fosfato-citrato, 10µL de extrato protéico vegetal (333,33mg/mL) e 25µL guaiacol. Em seguida foi agitada em vórtex. Depois foi feita uma solução B, contendo: a solução A e mais 25µL de H_2O_2. Esperou-se 3 minutos e adicionou-se 25 µL metabisulfito de sódio 2% (p/v) para parar a reação. A leitura foi feita em 450nm, em espectrofotômetro. Valores expressos em nmol/min/mg proteína.

3.4.2.1.5 Atividade da Catalase (CAT)

A catalase foi determinada segundo Kraus, Mckersie e Fletcher (1995) com modificações Azevedo et al. (1998). O experimento foi realizado a 25ºC em uma solução A contendo 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) acrescida de 25 µL de H_2O_2 (solução 25%). A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de extrato protéico vegetal (333,33mg/ml) a 1000 µL da solução A e a atividade foi determinada monitorando a degradação de H_2O_2 a 240 nm durante o período de um minuto e dosagem contínua em intervalos de um segundo em temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg proteína.

3.4.2.1.6 Atividade da Ascorbato peroxidase (APX)

A APX foi determinada segundo Nakano e Asada (1981). O experimento utilizou uma solução A (650 µL tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,0; 100 µL ascorbato 5 mM e 100 µL EDTA 1mM) que foi mantida no escuro e em banho-maria 30ºC. A esta solução foi adicionado 100 µL de H_2O_2 1 mM e 50 µL de extrato protéico vegetal (333,33mg/mL). As amostras foram lidas em espectrofotômetro em 290 nm. O resultado foi expresso em nmol/min/mg proteína.

3.5 Análise estatística

Todos os dados obtidos nos experimentos 1 e 2 foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando detectada diferença significativa, as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey (5%).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.1 Inoculação do fungo da ferrugem marrrom (*Puccinia melanocephala)*

Plantas RB835486, RB835089 (WT), P15 e P19 (VC) foram inoculadas com o fungo da ferrugem marrom. A variedade RB 835486 é suscetível e a variedade RB835089 (WT) é resistente à ferrugem marrom. O objetivo deste experimento foi constatar se a transformação genética com o gene *AtBI- 1* modifica a característica pré existente de resistência a ferrugem marrom nas plantas transformadas. Os resultados da análise da densidade de pústulas e do período de latência da ferrugem mostraram que as plantas P15 transformadas com o gene *AtBI-1* se tornaram mais suscetíveis do que a variedade controle RB835486 (Figura 11). Em condições normais, o período de latência (tempo entre a inoculação e a produção de esporos) de *P. melanocephala* tem duração média de 15 dias. Neste período o fungo já estava totalmente instalado nas folhas das plantas P15, revelando pústulas com muitos esporos, até mais que na variedade considerada suscetível RB835486. A densidade de pústulas foi significativamente (Tukey 5%) maior nas plantas de cana-de-açúcar transgênicas P 15 do que nas plantas RB835486, quando foi constatado 14 e 6,5 pústula por cm^2, respectivamente (Figura 11). Nas plantas controles (WT) e P19 (VC), durante os mesmo 15 dias, as pústulas ainda não haviam esporulado, e apresentavam-se pouco desenvolvidas nas folhas (Figura 11), confirmando a resistência da variedade RB835089 ao fungo da ferrugem marrom.

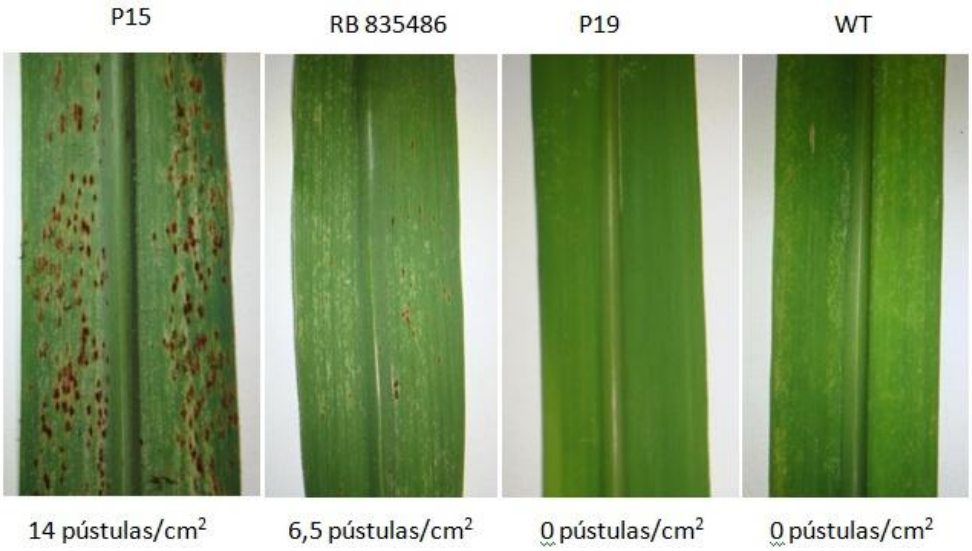


Figura 11- Fotos de segmentos de folhas de cana-de-açúcar com sintomas de ferrugem marrom. Plantas controles (WT) e P19 (VC), controles resistentes, e plantas transgênicas (P15) e RB 835486, suscetíveis.

Os mecanismos de reconhecimento dos agentes patogênicos pela via de receptores NB-LRR irão ativar genes de defesa das plantas e a resposta de hipersensibilidade (RH), que é

um tipo de morte celular programada (LUKASIK, TAKKEN, 2009; HEATH, 2000). Hückelhoven, Dechert e Kogel (2003) mostraram que plantas de cevada superexpressando BI-1 tiveram maior suscetibilidade a penetração do fungo *Blumeria graminis* e afirmaram que a expressão de *BI-1* afeta de modo negativo a defesa da planta contra patógenos biótroficos que têm o interesse em evitar a RH nas plantas infectadas. Justamente pelo motivo de *BI-1* evitar a RH nas plantas. E isto resulta em maior susceptibilidade das plantas que superexpressam este gene. As plantas de cana-de-açúcar transgênicas (P15) que sofreram inoculação do fungo *Puccinia melanocephala*, também biotrófico, confirmam os resultados de Hückelhoven, Dechert e Kogel (2003), passando de resistentes a suscetíveis a ferrugem marrom.

4.2 Experimento 1: imposição de déficit hídrico em plantas de 90 dias

4.2.1 Comportamento estomático e fotossintético das plantas

4.2.1.1 Taxa Fotossintética

O déficit hídrico afetou de maneira desigual a fotossíntese nos genótipos estudados (Figuras 12, 13 e 14). Após 24 dias sob déficit hídrico as plantas controle (WT) e P19 (VC) apresentaram colmos e folhas completamente secos, enquanto que as plantas P15 e P16 mantiveram a maioria das folhas verdes, com alguns poucos sinais de dessecamento, como extremidades necrosadas e enrolamento do limbo.

As plantas transgênicas P15 sem irrigação apresentaram do 12º DAT ao 19º DAT taxa fotossintética significativamente (Tukey 5%) elevada quando comparadas as plantas controles (WT) do mesmo tratamento (Figuras 12). Nas plantas P15, não irrigadas, decréscimos significativos na taxa fotossintética foram detectados somente após o 17º DAT. Os valores da assimilação de CO_2 chegaram próximos à zero apenas 24 dias após a suspensão da irrigação (Figura 12). Nas plantas controle (WT), não irrigadas, a taxa fotossintética média em condição de déficit hídrico decresceu significativamente após 10º DAT, com redução de mais de 50% da fotossíntese quando comparada à condição irrigada. Após 14 dias do início do tratamento, não foi mais detectada a assimilação de CO_2 nas plantas controle (WT) não irrigadas (Figuras 12, 13 e 14). As plantas P16 (Figura 12) apresentaram perfil de taxa fotossintética muito parecido com as plantas P15 (Figura 12), lembrando que ambas expressam o gene *AtBI-1* controlado pelo promotor *Ubi-1*.

As plantas transgênicas P16, não irrigadas apresentaram do 12º DAT ao 21º DAT taxa fotossintética significativamente (Tukey 5%) elevada quando comparadas as plantas controles

(WT) do mesmo tratamento (Figuras 12). As plantas P16 não irrigadas após o início da imposição do tratamento tiveram queda na taxa fotossintética até o 10º DAT que foi a mesma apresentada pelas plantas controles (WT) do mesmo tratamento. Porém as plantas P16 não irrigadas após o 10º DAT elevaram a taxa fotossintética apresentando decréscimos significativos somente após o 17º DAT. Os valores da assimilação de CO_2 chegaram próximos à zero apenas 24 dias após a suspensão da irrigação (Figuras 12) como as plantas P15 não irrigadas (Figura 12). As plantas P16 irrigadas mantiveram a taxa fotossintética elevada até o final do experimento assim como as plantas controles (WT) do mesmo tratamento (Figura 12).

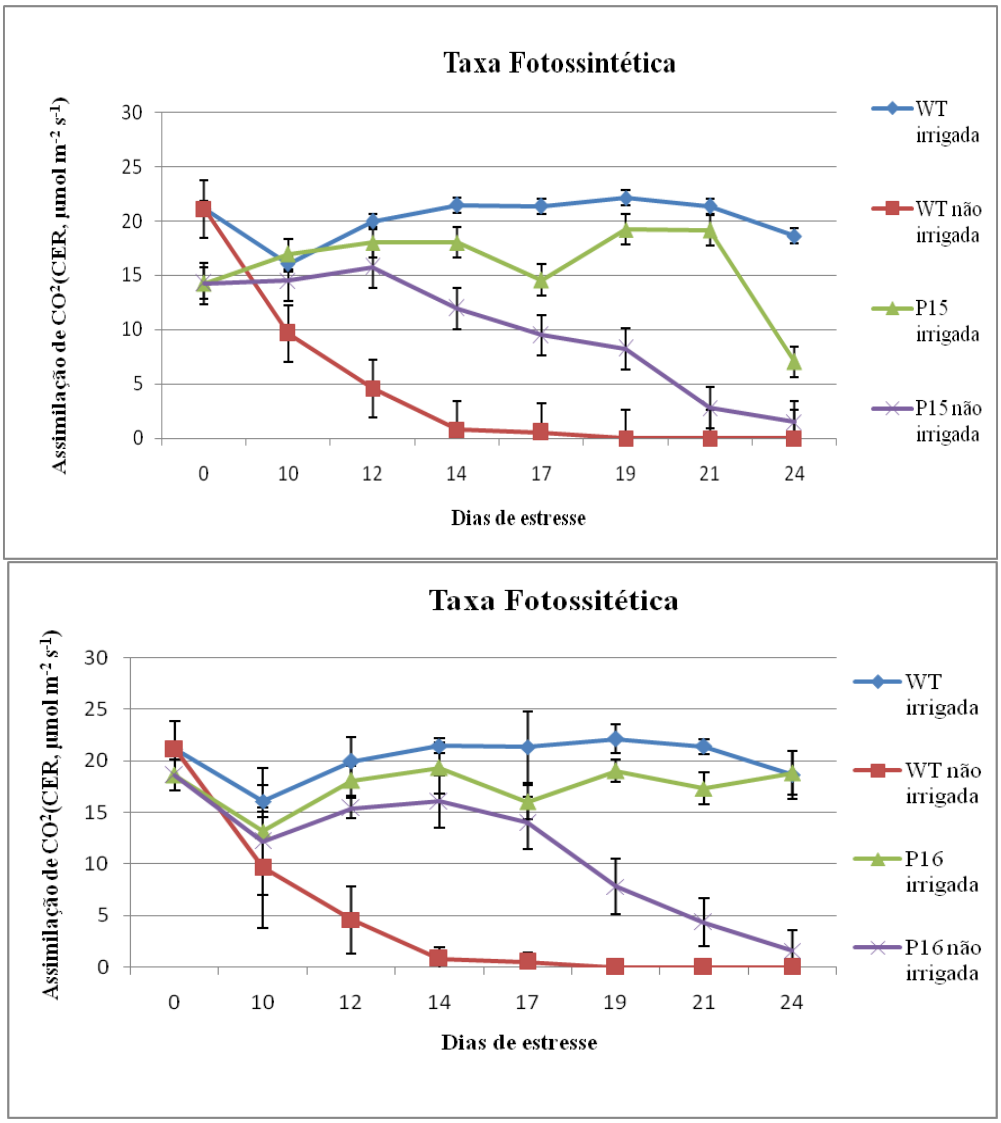


Figura 12 - Variação temporal das taxas de fotossíntese em plantas de cana-de-açúcar (controles (WT) e transgênicas, P15 e P16) irrigadas e não irrigadas. As plantas P15 e P16 possuem a expressão do gene *AtBI-1* controlada pelo promotor *Ubi-1*.

Nas plantas P19 (VC), a taxa média de fotossíntese em condição de déficit hídrico decresceu significativamente após o 10º DAT, com redução de mais de 70% da fotossíntese no 12º DAT quando comparada à condição irrigada (Figura 13). Após o 14º DAT, não foi mais detectada a assimilação de CO_2 nestas plantas (Figura 13). As plantas P19 (VC) apresentaram o mesmo perfil de fotossíntese que as plantas controles (WT) durante todo o experimento (Figura 13).

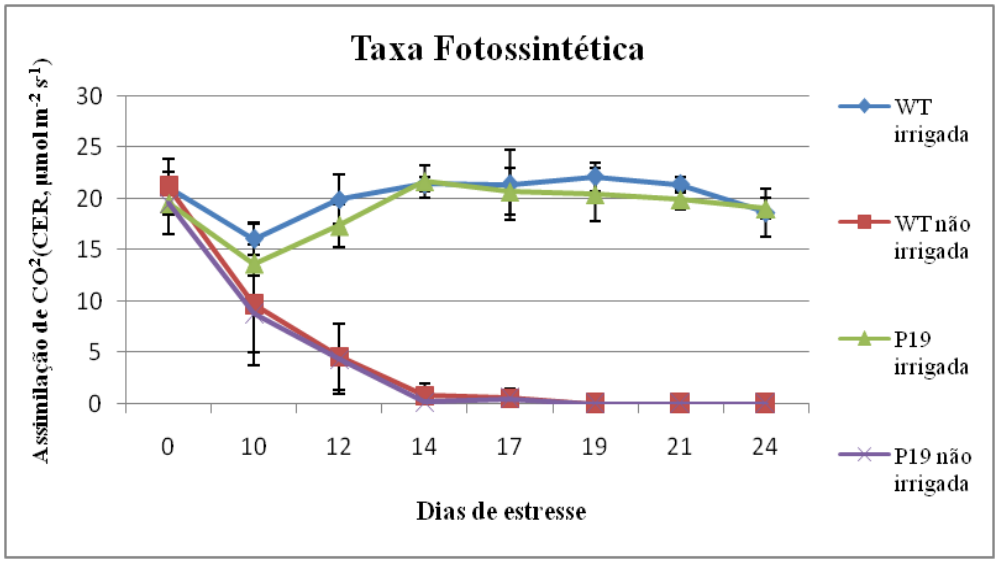


Figura 13- Variação temporal das taxas de fotossíntese em plantas de cana-de-açúcar (controle (WT) e transgênica P19 (VC)) irrigadas e não irrigadas. As plantas P19(VC) apresentam resultado positivo para a inserção do gene de seleção (*neo*) e negativo para o gene de interesse.

As plantas transgênicas P21 também apresentam expressão do gene *AtBI-1* controlada pelo promotor da ubiquitina do milho (*Ubi-1*). Entretanto, estas plantas se mostraram menos tolerantes ao déficit hídrico quando comparadas às plantas P15 e P16, nas análises de taxa fotossintética, mas em relação à controle (WT) mantiveram a taxa fotossintética superior do 12º até 14º DAT (Figura 14).

As plantas transgênicas P1 apresentam expressão do gene *AtBI-1* controlada pelo promotor *CaMV35S*. Em arroz o promotor *CaMV35S* é amplamente usado como um promotor constitutivo forte (TERADA; SHIMAMOTO, 1990). Omirulleh et al. (1993) e Mitsuhara et al. (1996) relataram que *CaMV35S* pode elevar a expressão de genes tanto em milho como em arroz. Porém nossas análises não detectaram diferenças significativas nas taxas de fotossíntese quando comparadas às plantas controles (WT) (Figura 14). Lakshmanan et al., 2005 colocam que o uso do promotor *CaMV35S* resulta em baixos níveis de expressão e

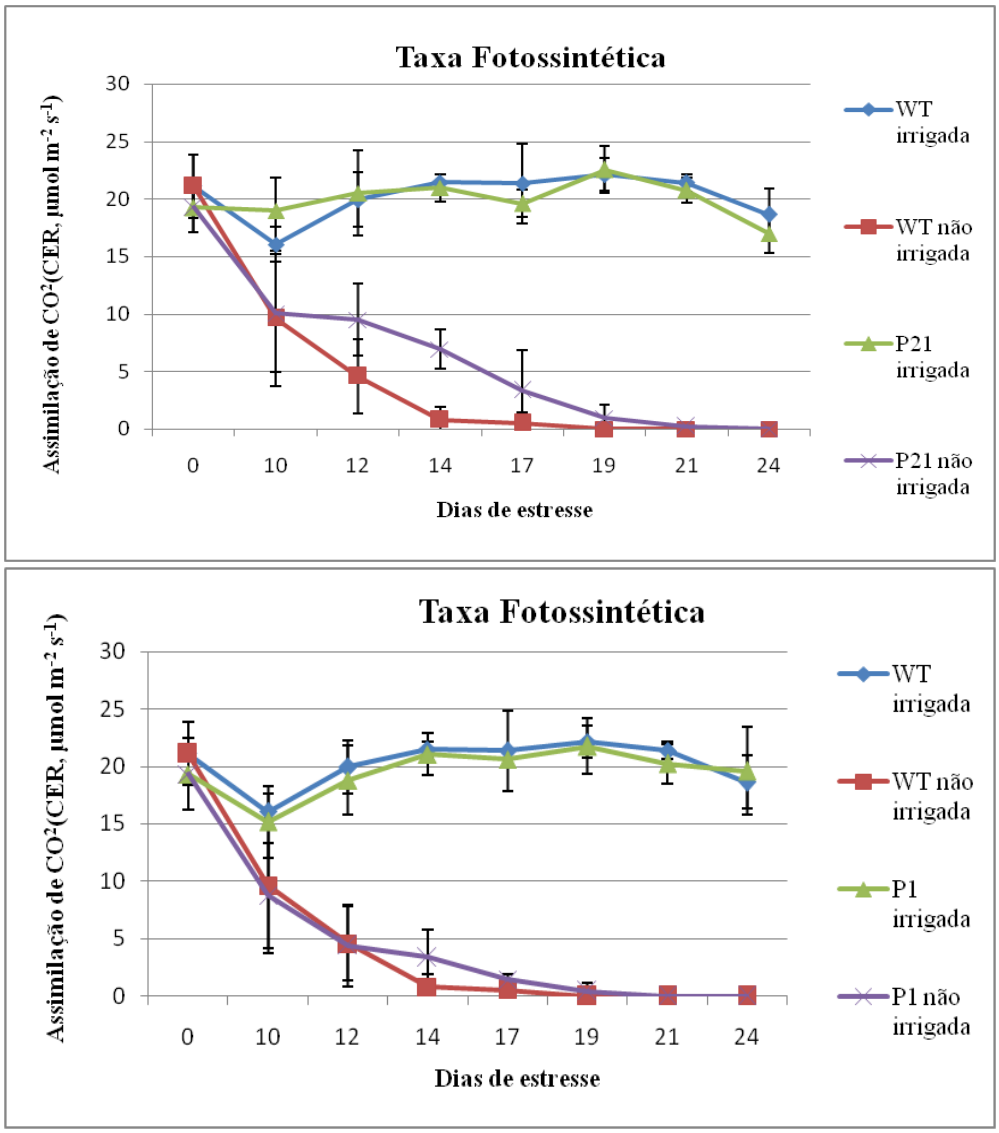


Figura 14 - Variação temporal das taxas de fotossíntese em plantas de cana-de-açúcar (controle (WT) e transgênicas, P1 e P21) irrigadas e não irrigadas. As plantas P21 possuem a expressão do gene *AtBI-1* controlada pelo promotor *Ubi-1*. Nas plantas P1 a expressão do gene *AtBI-1* é controlada pelo promotor *CaMV35S*.

estabilidade dos transgenes quando utilizado em monocotiledôneas, incluindo cana-de-açúcar. Em nossos resultados, apesar do elevado nível de expressão detectado em qPCR (Tabela 1), as plantas P1 não apresentaram o fenótipo das plantas P15 e P16, pois efeitos pós transcricionais podem ter afetado a síntese de proteínas, como o colocado por Vogel e Marcotte (2012) que dizem que a conservação e síntese de proteína compreende uma rede de processos e que a correlação entre expressão gênica, pelo nível de mRNA transcrito, e quantidade de proteínas deve ser cautelosa.

Birch, Bower, e Elliott (2010) mostraram em seus ensaios comparativos de expressão que o promotor *Ubi-1* é 10 vezes mais forte que o promotor *CaMV35S* em planta de cana-de-

açúcar. Os resultados deste trabalho estão de acordo com os autores, uma vez que as plantas P16 e P15 revelaram através dos dados, taxa fotossintética (Figura 12) mais elevada do que as plantas P1(Figura 14). Apesar da plantas P1 terem apresentado alto nível de expressão por qPCR.

As plantas P21, que possuem o promotor *Ubi-1*, não mostraram a mesma tolerância a seca das plantas P15 e P16, demonstrada pela taxa fotossintética (Figura 14). Provavelmente o local de inserção do transgene não favoreceu a plena expressão da proteína BI-1 e envolve o que foi colocado para as plantas P1 em relação aos efeitos pós transcricionais relatado por Vogel e Marcotte (2010). Ainda assim, verifica-se que a taxa de fotossíntese é superior às detectadas nas plantas controles (WT) e P1 sob as mesmas condições de déficit

4.2.1.2 Condutância estomática

A condutância estomática foi mensurada apenas nas plantas controles (WT), P19 (VC), P15 e P16. As plantas P1 e P21 não foram analisadas por manterem os mesmos perfis das plantas controles (WT) e P19 (VC) nos resultados de taxa fotossintética.

Observa-se que as plantas controles (WT) sem irrigação tiveram queda abrupta da condutância estomática logo após a indução do déficit hídrico até o 14º DAT, após este tempo a condutância estomática nas plantas controles (WT) se manteve nula até o fim do experimento (Figura 15 e 16). Este resultado revelou que as plantas estavam em déficit hídrico severo, confirmando os resultados de taxa fotossintética nestas plantas, que foi nula após o 14º DAT. Os dados de comportamento estomático da plantas controles (WT) irrigadas também confirmam os resultados de taxa fotossintética da mesma mantendo-se entre 0,11 e 0,16 g_s, mol m^{-2} s^{-1} durante o período de até 21º DAT (Figura 12,13 e 14).

As plantas transgênicas P15 mostraram valores de condutância estomática que confirmam os resultados da Figura 12. As plantas transgênicas, P15, sem irrigação tiveram decréscimo na condutância estomática apenas após o 14º DAT enquanto as plantas controles (WT), do mesmo tratamento, no 10º DAT já mostravam condutância baixa de aproximadamente 0,3 g_s, mol m^{-2} s^{-1} e ao 14º DAT, esta foi quase nula (Figura 15).

O comportamento das plantas P16 segue o obtido com as plantas P15 do tratamento sem irrigação, contudo difere no 17º DAT, quando a condutância estomática decresce (Figura 15). Os dados de condutância estomática da plantas P16 também confirmam os resultados da Figura 12.

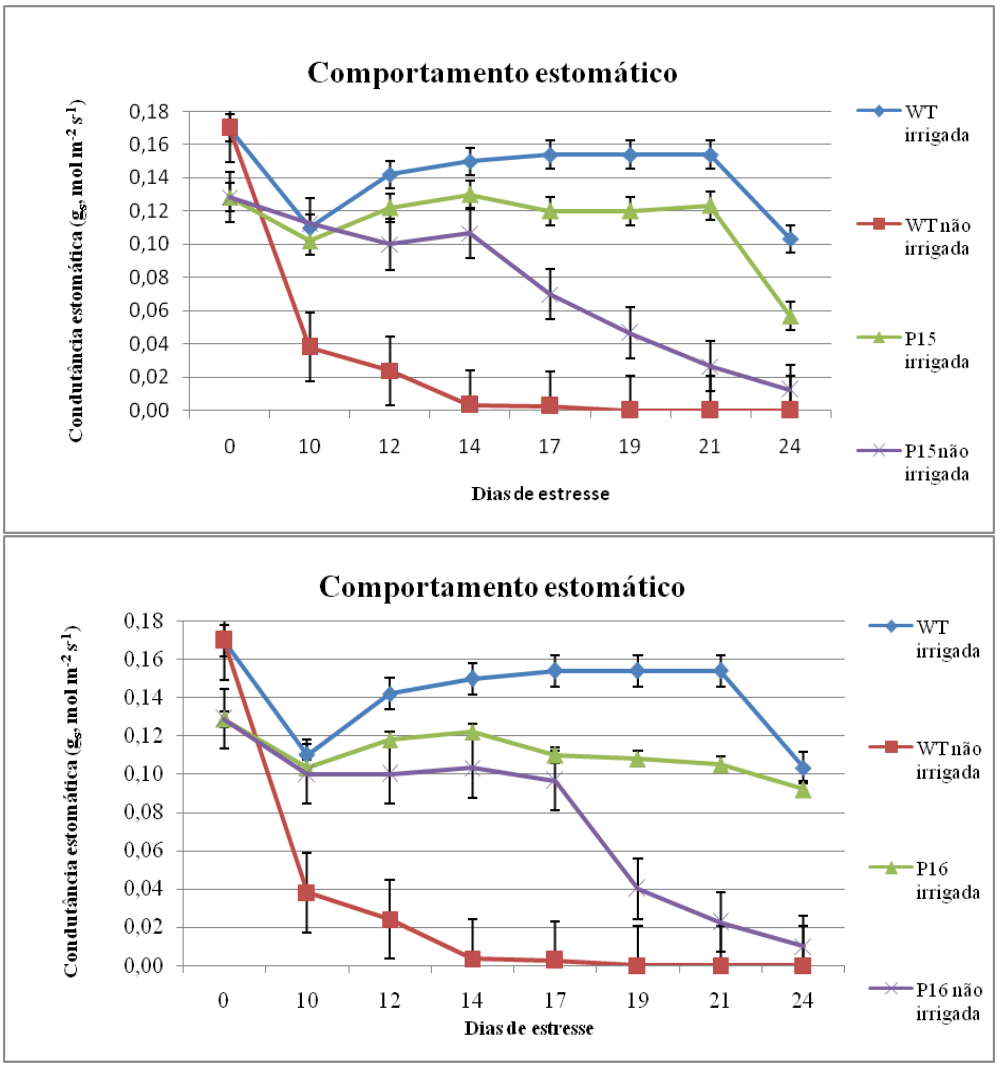


Figura 15- Variação temporal da condutância estomática em plantas de cana-de-açúcar (controles (WT) e transgênicas, P15 e P16) irrigadas e não irrigadas. As plantas P15 e P16 têm a expressão do gene *AtBI-1* controlada pelo promotor *Ubi-1*.

No tratamento sem irrigação, as plantas P19 (VC) e as controles (WT) apresentam os mesmos resultados de condutância estomática (Figura 16). Estas plantas se encontravam em déficit hídrico a partir do 12º DAT, confirmando os dados da figura 13, que analisa a taxa fotossintética das mesmas. Portanto como nos resultados de taxa fotossintética (Figura 13) as plantas controles (WT) e P19(VC) apresentaram o mesmo perfil de comportamento estomático (Figura 16).

A redução das taxas de assimilação de CO_2 causada por déficit hídrico é acompanhada pela redução da condutância estomática (FLEXAS; MEDRANO, 2002; GHANNOUM et al., 2003; GHANNOUM, 2009). O déficit hídrico desencadeia o fechamento dos estômatos, que é uma estratégia da plantas à redução da perda de água (TAIZ; ZEIGER, 2004). Esta estratégia é percebida pela raiz, e o processo de fechamento estomático começa a ser mediado pelo ácido abscíssico (ABA) que, através da produção de H_2O_2 e ativação de canais de Ca^{2+}, irá

fechar os estômatos (PEI et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004). Neste trabalho, as plantas de cana-de-açúcar superexpresando *AtBI-1* apresentaram fechamento total dos estômatos (gs = zero) apenas 24 dias após o corte da irrigação (Figuras 15). Além disso, a continuidade na assimilação de CO_2 indica a manutenção do metabolismo primário da planta mesmo em condição de estresse

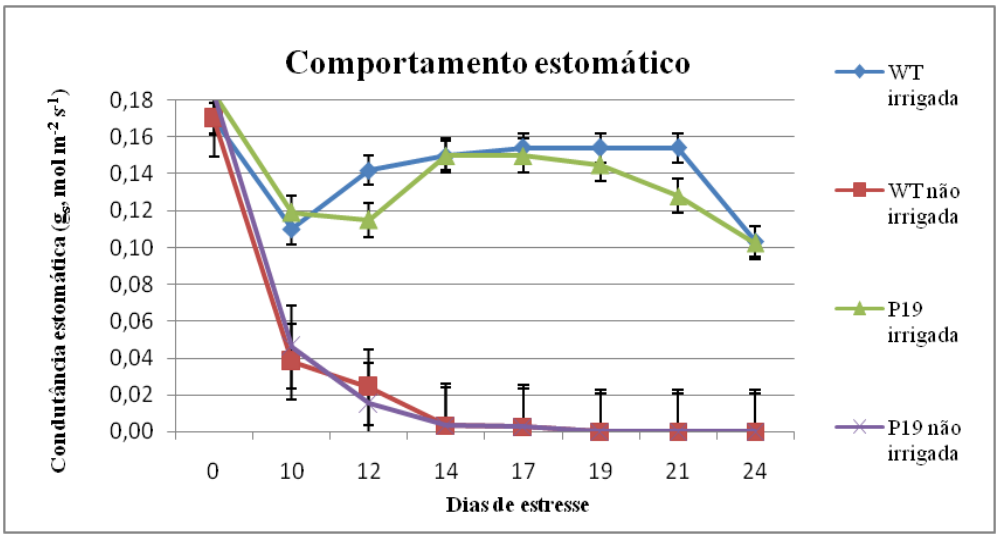


Figura 16- Variação temporal da condutância estomática em plantas de cana-de-açúcar (controles (WT) e transgênicas P19 (VC)) irrigadas e não irrigadas.

A capacidade de manter os processos fisiológicos, tais como a fotossíntese, durante o déficit hídrico moderado, é crucial para manter a produtividade (ZHAO; GLAZ; COMSTOCK, 2010). Com os resultados de taxa fotossintética e condutância estomática podemos afirmar que os efeitos da indisponibilidade de água foram contornados pela expressão do gene *AtBI-1*.

4.2.2 Conteúdo relativo de água nas folhas (RWC)

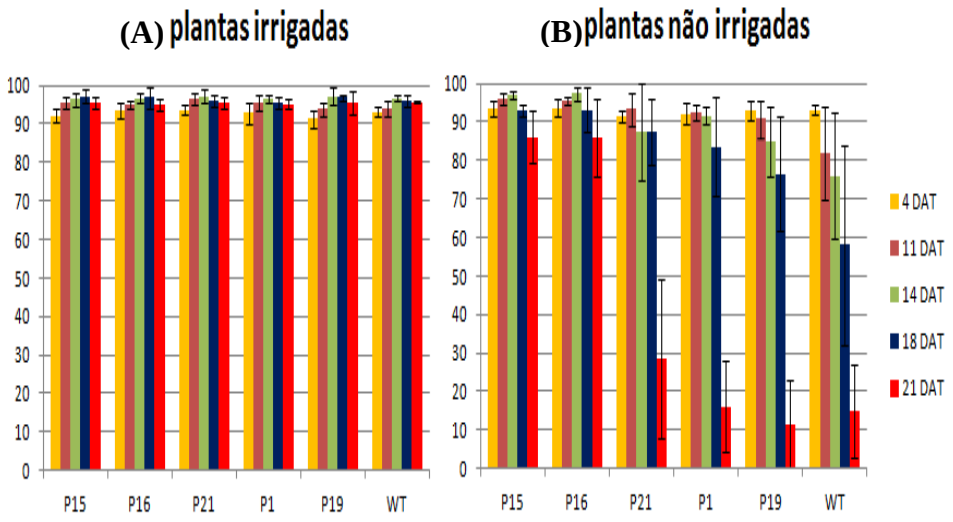
A detecção precoce do déficit hídrico é importante para o manejo da irrigação e pode servir como um mecanismo de seleção de plantas tolerantes à seca (ZHAO; GLAZ; COMSTOCK, 2010). Os índices de conteúdo relativo de água (RWC) são utilizados frequentemente como controle da intensidade do déficit hídrico (FLEXAS; MEDRANO, 2002).

As avaliações dos teores de água nas folhas mostraram resultados similares aos obtidos para taxa fotossintética. Plantas transgênicas P15 e P16 não apresentaram reduções significativas nos teores de água na folha mesmo quando submetidas a 24 dias sem irrigação (Figura 17). Após o 21º DAT, o teor de água nas folhas destas plantas foi somente 10 % inferior ao observado nas plantas irrigadas.

As demais plantas apresentaram declínio significativo no RWC no decorrer do experimento (Figura 17). As plantas transgênicas P21 continham, em média, apenas 28% de RWC após 21 dias de estiagem. As reduções no teor de água nas plantas P1, P19(VC) e controles (WT) foram ainda mais significativas com valores de 16, 12 e 15%, respectivamente. O aspecto visual das plantas indicou que estavam mortas no final do experimento.

Nas plantas irrigadas, o teor de água nas folhas permaneceu constante durante todo o experimento com índices superiores a 90 % (Figura 17).

Rodrigues et al. (2011) constataram que o déficit hídrico em cana-de-açúcar diminuiu o RWC de 87% para 64%, e afirmou que as plantas que apresentaram estes resultados estavam sob déficit hídrico grave. Graça et al., observaram maior RWC em variedades de cana-de-açúcar tolerantes ao déficit hídrico e assim como Silva et al. (2007) colocam este parâmetro como um indicativo se a planta está sob deficiência hídrica ou não.



DAT = dias após o início do tratamento

Figura 17. Variação temporal do teor de água nas folhas (%) de plantas de cana-de-açúcar transformadas geneticamente com o gene *AtBI-1* , em condição irrigada (A) e não irrigadas (B). Valores médios (n=5) ± desvio padrão.

Com base nos resultados apresentados de taxa fotossintética, condutância estomática e RWC, podemos dizer que no tratamento sem rega, as plantas P15 e P16 estavam em déficit hídrico leve, enquanto as plantas P21 estavam em déficit hídrico moderado e as plantas P1, controles (WT) e P19 (VC) em déficit hídrico severo.

4.2.3 Parâmetros Morfológicos

Análises morfológicas de altura de planta, circunferência do colmo e contagem de estômatos e tricomas foram realizadas nas plantas P15 e controles (WT), com 5 repetições cada, antes do início dos tratamentos.

Foi observado que as plantas transgênicas P15 apresentaram diferenças significativas entre as médias de altura quando comparadas às plantas controles (WT) (Tabela 2). As plantas P15 apresentaram cerca de 40 cm de altura a menos que as plantas controles (WT). Entretanto, não houve diferença nas medidas de circunferência dos colmos, avaliada na porção mediana do primeiro colmo na base das plantas (Tabela 2).

Para Kelling (1995) o déficit hídrico pode afetar negativamente alguns fatores morfofisiológicos. Silva et al. (2008) colocam que em cana-de-açúcar a altura do colmo, número e diâmetro de colmos, número de folhas verdes e área foliar, são característica morfológicas que podem ser usadas para selecionar variedades quanto a tolerância ou susceptibilidade ao déficit hídrico.

Redução da área foliar e baixa altura podem conferir maior tolerância a déficit hídrico, porém a produtividade destas plantas possivelmente será baixa devido à reduzida produção de fotoassimilados (SINCLAIR; MUCHOW, 2001) uma vez que a incidência de raios solares sobre a folha é diminuído e por consequência a capitação de energia pelo complexo antena das células das mesmas (SANTOS; CARLESSO, 1998).

Tabela 2. Avaliação de parâmetros morfológicos de plantas de cana-de-açúcar (P15) transformadas com o gene *BI-1* de *A. thaliana* e de plantas controles (WT). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre plantas (ANOVA).

Parâmetros morfológicos	Plantas P15	Plantas WT
Altura (cm)	100,3 (±8,0)**B**	144,2 (±6,7)**A**
CDC (cm)	12,0 (±0,2)**A**	11,9 (±0,7)**A**

CDC – circunferência de colmo.

As análises de densidade de estômatos e tricomas tiveram como objetivo determinar o número de estômatos e tricomas nas plantas transgênicas e controles. Bosabalidis e Kofidis (2002) observaram aumento nos números de estômatos e tricomas em folhas de oliveira submetidas ao déficit hídrico, e concluíram que este fenômeno era adaptação morfo-fisiológica ao déficit hídrico. Pincelli e Silva (2012) afirmam que o déficit hídrico promoveu aumento na densidade estomática de cultivares de cana-de-açúcar tolerantes.

As análises de densidade de estômatos e tricomas realizadas nas plantas P15 e controles (WT) não apresentaram diferença significativa em folhas (Figura 18). Kouwenberg et al.(2004) colocam que a densidade estomática pode alterar-se durante o crescimento da planta e conforme seu estado de hidratação, assim este relato poderia ocorrer nas plantas transgênicas caso fossem analisadas sob déficit hídrico prolongado. Porém o objetivo desta análise foi observar se estas estruturas eram em maior quantidade nas plantas transgênicas constitutivamente, influenciando assim na tolerância ao déficit hídrico destas plantas. Como os resultados não mostraram diferenças significativas (Tukey 5%), possivelmente a densidade de estomâtos e tricomas não está relacionada com resistência ao déficit hídrico nas plantas P15 que expressam gene *AtBI-1* (Figura 18).

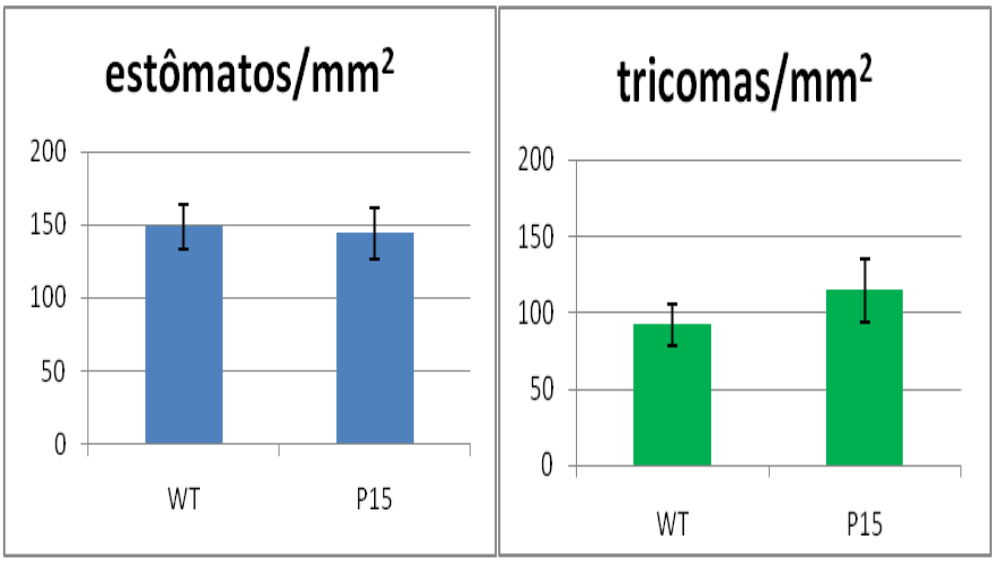


Figura 18 – Quantidade de estômatos e tricomas presentes em folhas de plantas de cana-de-açúcar controles (WT) e transgênicas (P15).

4.3 Experimento 2: imposição de déficit hídrico em plantas de 60 dias

O experimento 2 foi realizado devido as plantas do experimento 1 estarem na sua maioria mortas no 24º DAT, que impossibilitou a coleta de amostras para as análises bioquímicas. Devido as plantas P15 e P16 terem apresentado comportamento similares durante o experimento 1, e as plantas P19(VC) e P1 também terem apresentado o mesmo perfil que as plantas controles (WT) durante o experimento 1, utilizou-se apenas as plantas P15 e controles (WT) neste novo experimento. As plantas P21 não foram usadas por apresentarem pouca diferença estatística (Tukey 5%) em relação às plantas controles (WT).

4.3.1 Taxa Fotosssintética

As plantas deste experimento foram monitoradas pela taxa fotossintética, ou seja, pela assimilação de CO_2, para estabelecer quando entrariam em estresse. Os dados mostram que ocorreu redução na taxa fotossintética no 17º DAT, quando as plantas controle (WT) não irrigadas apresentaram baixa assimilação de CO_2 que diminui de 25µmol $m^{-2}s^{-1}$ para 5,0 µmol $m^{-2}s^{-1}$ (Figura 25). As plantas transgênicas P15 não irrigadas mantiveram a taxa fotossintética elevada, com altos níveis de assimilação de CO_2, entre 25 e 31 µmol $m^{-2}s^{-1}$. Foi possível observar que as plantas controles (WT) e P15 irrigadas e as plantas P15 sem rega não se encontravam em situação de déficit hídrico aos 17º DAT (Figura 25).

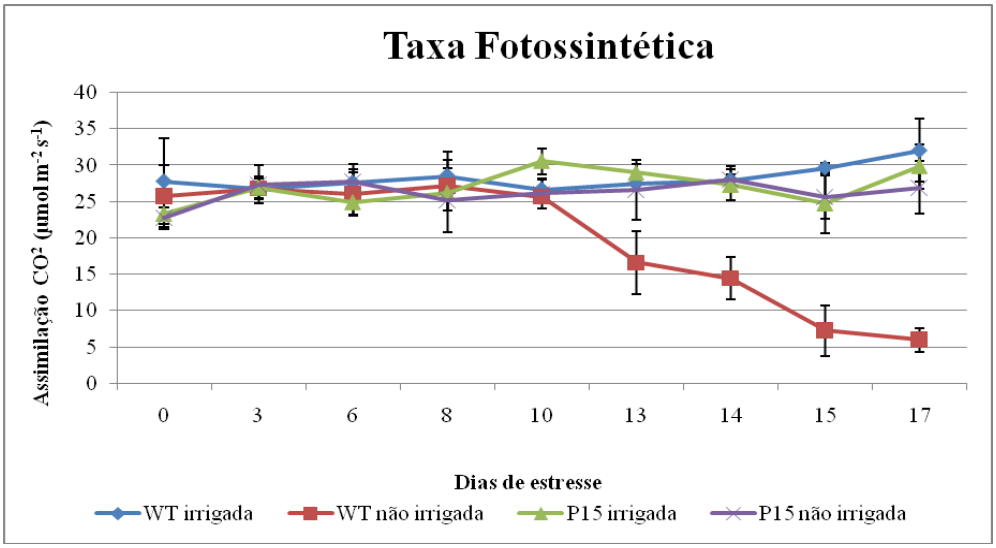


Figura 25- Variação temporal (dias) das taxas de fotossíntese em plantas de cana-de-açúcar controles (WT) e transgênicas (P15) irrigadas e não irrigadas.

4.3.2 Prolina

Os resultados demonstram que as plantas controles (WT) e as plantas transformadas P15 do tratamento com irrigação aos 17º DAT apresentaram a mesma quantidade de prolina (Figura 26). Entretanto no tratamento sem rega as plantas controles (WT) tiveram aumento significativo de mais de 90% de teor prolina em relação plantas transformadas P15, que permaneceram com o nível de prolina baixo (18,5 µg/g peso fresco) (Figura 26).

A prolina é tida como indicador de déficit hídrico por ser um soluto que participa do ajuste osmótico das células sob deficiência hídrica (KISHOR et al., 1995; SHAH; DUBEY, 1997). Os teores médios de prolina nas plantas controles (WT) irrigadas foram de 22,4 µg/g peso fresco enquanto que nas plantas estressadas esse valor foi de 449,1µg/g peso fresco aos

17º DAT. Esses níveis de prolina podem ser utilizados como parâmetros do nível de estresse provocado pela escassez de água nas plantas controles (WT), confirmando os resultados de Carlin (2009); Queiroz (2008) e Rehin et al. (2011) que apontam o soluto como indicador de déficit hídrico em variedades comerciais de cana-de-açúcar. Ju et al. (2013) estudaram o gene *AtRZF1* de *Arabidopsis thaliana* em resposta a seca e constataram que seu mutante era menos sensível a seca em relação a planta sem mutação, justamente por conter baixo teor de prolina durante o déficit hídrico.

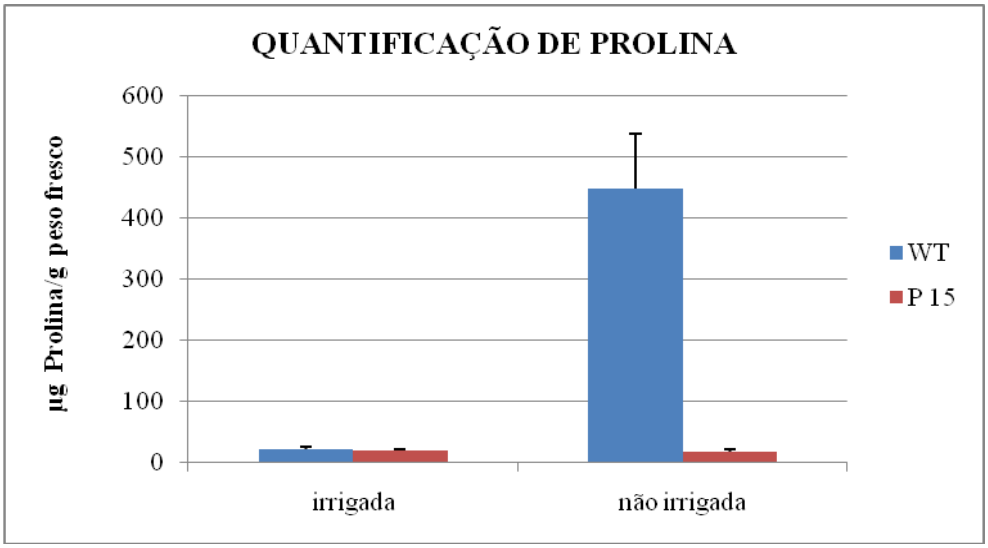


Figura 26. Quantidade (µg) de prolina por peso fresco em plantas de cana-de-açúcar controles (WT) e plantas transformadas (P15) irrigadas e não irrigadas.

Diante dos resultados dos teores de prolina nas plantas transgênicas terem permanecido estáveis durante todo o experimento (20,9µg/g peso fresco nas plantas irrigadas e 18,5 µg/g peso fresco nas plantas não irrigadas) é possível que o ajuste osmótico com acúmulo de prolina não seja o responsável pela tolerância à seca das plantas transgênicas expressando o gene *AtBI-1*.

4.3.3 Atividade enzimática: Guaiacol peroxidase (GPOX), Ascorbato peroxidase (APX) e Catalase (CAT)

No 17º DAT folhas de todas as plantas participantes do experimento foram coletadas e utilizadas nas análises de atividade das enzimas antioxidativas CAT, GPOX e APX.

A quantificação da atividade GPOX não mostrou diferença estatística (Tukey 5%) entre plantas controles (WT) e plantas transgênicas P15, irrigadas e não irrigadas (Figura 27). Cia (2010) estudou 20 variedades comerciais de cana-de-açúcar sob déficit hídrico e constatou que destas 20 plantas, 8 não tiveram alteração na atividade da enzima GPOX entre

10 e 20 dias de seca, e coloca que a queda na atividade de uma ou mais enzimas foi acompanhado pelo incremento na atividade de outras enzimas, justamente o que ocorreu neste trabalho com incremento da atividade de APX e CAT.

Contudo, observa-se que as plantas transgênicas mantiveram a atividade de GPOX, tanto no tratamento com irrigação, como no sem irrigação, revelando que estas não usaram a enzima para degradar os EAOs formados pela situação de estresse enfrentada.

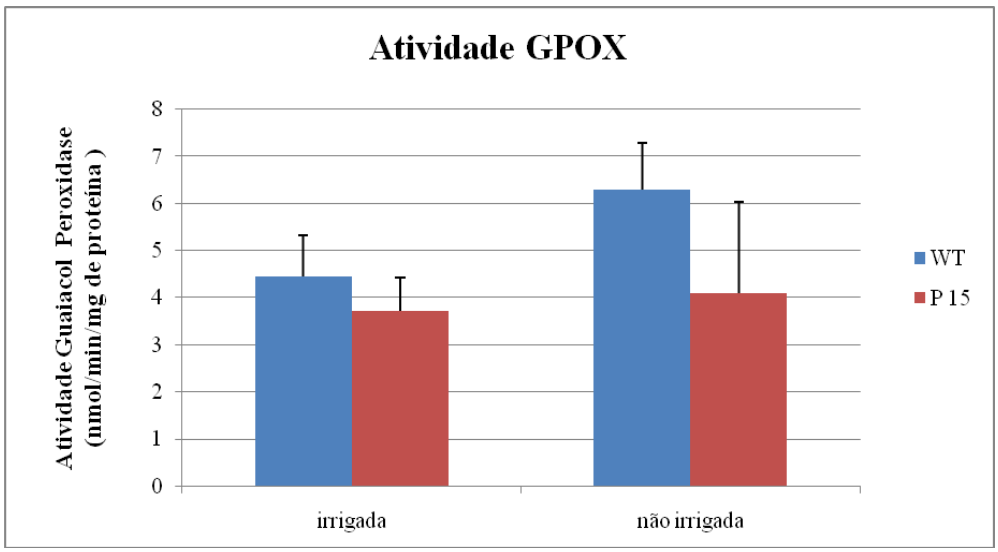


Figura 27- Quantidade de GPOX em nmol/min/mg de proteína em plantas de cana-de-açúcar controle (WT) e transgênicas (P15), irrigadas e não irrigadas

O mesmo padrão de resultado foi observado nas análises de atividade da APX. Plantas controles (WT) irrigadas apresentaram atividade da APX 272 nmol/min/mg de proteína a mais que as plantas transgênicas irrigadas no 17º (Figura 28). Resultado ainda mais marcante foi observado nas plantas não irrigadas em que as plantas P15 apresentaram atividade da APX 678 nmol/min/mg de proteína a menos que as plantas controles (WT) aos 17º DAT (Figura 28).

Os resultados da atividade da catalase nas plantas transgênicas mostraram alta atividade da enzima em condições de irrigação. Os valores de atividade foram de 89,08 nmol /min/mg de proteína nas plantas transgênicas P15 contra 36,27 nmol/min/mg de proteína que nas plantas controle (WT). Quando comparamos as plantas controles (WT) irrigadas com as não-irrigadas, houve elevação da atividade da CAT para 63,77 nmol/min/mg de proteína, enquanto a comparação entre plantas transgênicas irrigadas e não-irrigadas, apresentaram queda de 33,06 nmol/min/mg de proteína na atividade da enzima Por outro lado, não houve diferença estatística entre as plantas P15 e controles (WT) não irrigadas (Figura 29).

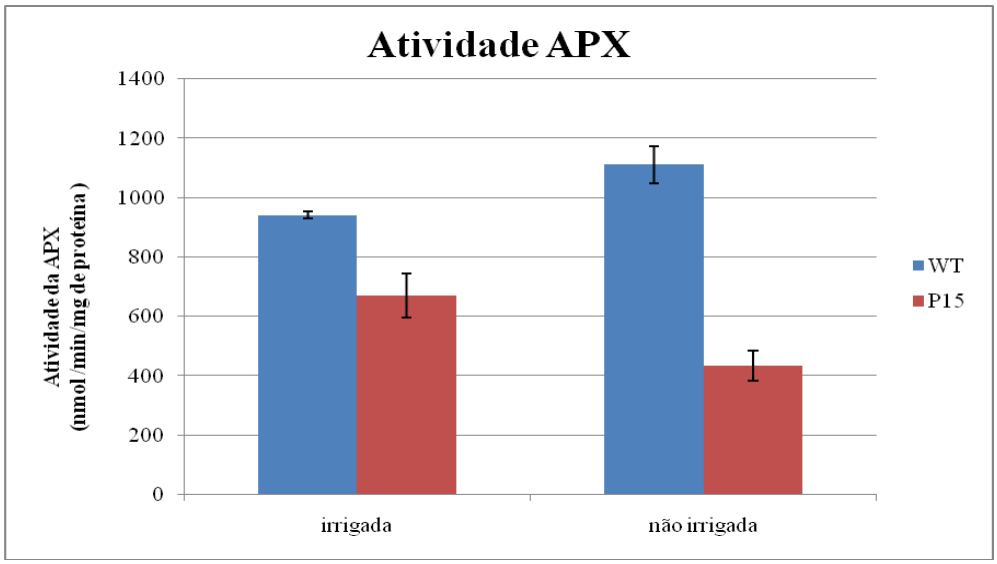


Figura 28- Quantidade APX em nmol/min/mg de proteína em plantas de cana-de-açúcar controle (WT) e transgênicas (P15), irrigadas e não irrigadas.

.

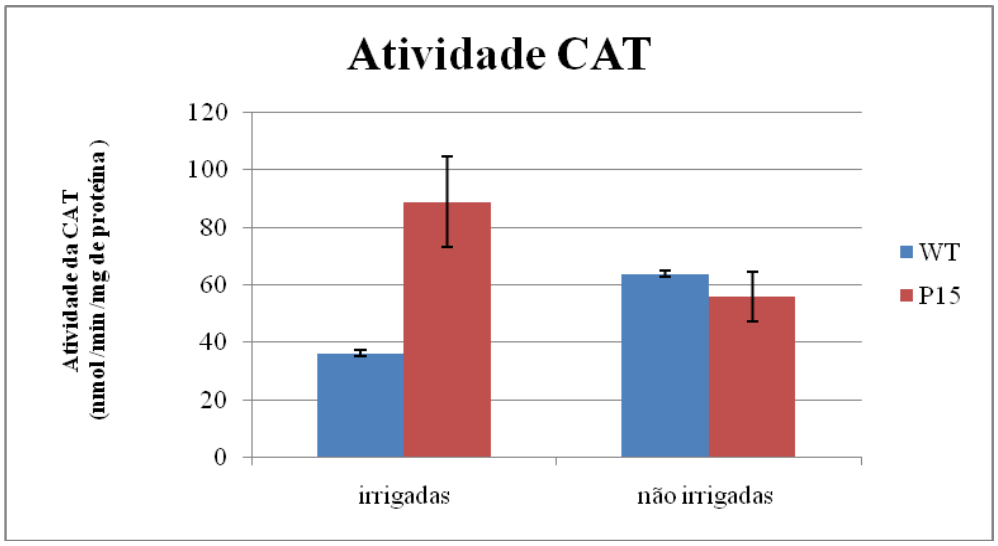


Figura. 29- Quantidade de CAT em nmol/min/mg de de proteína em plantas de cana-de-açúcar controle (WT) e transgênicas (P15), irrigadas e não irrigadas

As plantas controles (WT) apresentaram aumento significativo (Tukey 5%) nos teores de APX e CAT (Figuras 28 e 29) quando colocas em condições de déficit hídrico. (Figuras 28 e 29). Podemos dizer que estas enzimas tiveram aumento nas suas atividades na tentativa de remoção de EAOs, que são produzidos em maior quantidade durante o déficit hídrico, e assim evitar danos as células. Estes resultados são similares aos apresentados por CIA, 2010 e

WILLADINO et al., 2011 que analisaram variedades de cana-de-açúcar durante o déficit hídrico.

Zhang et al. (2013), estudaram plantas de arroz que superexpressavam APX e concluíram que esta enzima é importante no crescimento e desenvolvimento do arroz protegendo-o de estresses abióticos através da eliminação de EAOs. Plantas *de Medicago sativa* superexpressando o gene *OsAPx2*, que aumenta a atividade de APX, promoveram uma maior remoção de H_2O_2 e maior resistência a estresse salino quando comparadas com plantas sem a expressão do gene (GUAN; TAKANO; LIU, 2012).

Hameed et al. (2011) analisaram sistema de defesa antioxidante em sete genótipos diferentes de trigo, sob diferentes condições de irrigação e umidade de solo. Eles observaram que os genótipos com maior atividade das enzimas CAT eram mais tolerantes ao déficit hídrico no tratamentos sem rega. Ao mesmo tempo Chugh, Kaur e Gupta (2011) estudaram diferentes genótipos de milho e também destacaram a ação da CAT na destruição dos EAOs, e posterior resistência a seca em plantas com altos níveis de atividade destas enzimas.

Porém os resultados de atividades das enzimas GPOX, APX e CAT nas plantas transgênicas com expressão do gene *AtBI-1* durante o déficit hídrico aponta que nenhuma destas enzimas foi tão estimuladas como nas plantas controles (WT) do mesmo tratamento (Figuras 27, 28 e 29). Possivelmente a atenuação a morte celular e consequentemente, a tolerância ao déficit hídrico conferida à estas plantas pela ação do gene *AtBI-1*, não está relacionada com os tentativa de diminuir os níveis de EAOs pelo aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante. Este resultado está de acordo com o que foi relatado por Baek et al. (2004) e Kawai-Yamada, Ohori e Uchimiya (2004) em *Arabidopsis thaliana*, quando a superexpressão de *AtBI-1* atenuou a MCP, induzida pela expressão ectópica do gene *Bax* de mamíferos, sem reduzir significativamente os níveis de EAOs.

As plantas P15 irrigadas apresentaram 2,5 x mais atividade constitutiva de catalase que as plantas controles (WT) no mesmo tratamento (Figura 29). As análises foram refeitas utilizando as plantas do experimento 1, e os resultados foram similares (resultados não mostrados).

A catalase encontra-se em maior concentração nos peroxissomos e em seu precursor, o retículo endoplasmático (SCANDALIOS, 2005; TITORENKO; MULLEN, 2006), ao contrário de outras enzimas antioxidantes, que estão presentes em variados compartimentos celulares. Em situação de estresse o retículo endoplasmático produz EAOs (HENKE et al.,

2011). Devido a sua localização e atividade, a catalase pode degradar rapidamente o H_2O_2, antes de sua difusão para outras partes da célula (SCANDALIOS, 2005). De maneira interessante, tanto a expressão do gene *Bax Inhibitor-1* quanto a atividade da catalase foram relacionados a diversos tipos de câncer e ao envelhecimento em humanos e animais (BECHTEL; BAUER, 2009; GRZMIL et al., 2003; LEE et al., 2007; MELOV et al., 2000). Sabe-se que a porção C-terminal de *AtBI-1* interage com a proteína AtCaM7, uma calmodolina, e que mutantes que perdem esta possibilidade de ligação não inibem a morte celular induzida por *Bax*, apoiando a conclusão de que a supressão de morte celular por *AtBI-1* envolve a translocação de Ca^{2+} no RE ou no Golgi (IHARA-OHORI, 2007). Neste cenário, nossos resultados apontam para a possibilidade da interação entre *AtBI-1* e calmodolinas (IHARA-OHORI et al., 2007) mediar a indução da atividade de catalases na presenças de Ca^{2+}. Futuros estudos podem averiguar se BI-1 é essencial para a ativação das catalases por calmodolinas.

5 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados apresentados concluí-se que:

- A expressão do gene *AtBI-1* causa a quebra de resistência ao fungo da ferrugem marrom *(Puccinia melanocephala)* em plantas transgênicas.

- O promotor *Ubi-1* mostrou-se expressivo em plantas de cana-de-açúcar.

- Plantas de cana-de-açúcar modificadas expressando o gene *AtBI-1* controlado pelo promotor da ubiquitina do milho (*Ubi1*) possuem maior IAF e maior resistência ao déficit hídrico até 24 dias sem água do que plantas controles (WT) em condições de casa-de-vegetação.

- Não há diferença quanto a quantidade de estômatos e tricomas nas folhas e a circunferência do colmo em plantas transgênicas e controles (WT).

- Após17 dias sem água as planta transgênicas (P15) não mostraram diferença nos teores de prolina, enquanto plantas controles (WT) tiveram um aumento de 426,7 µg prolina/g peso fresco.

- A atividade das enzimas GPOX, APX e CAT nas plantas (P15) transgênicas sem irrigação foi menor do que nas plantas controles (WT) do mesmo tratamento.

- Plantas transgênicas (P15) possuem nível elevado da atividade constitutiva de catalase em relação às plantas controles (WT).

REFERÊNCIAS

AHMED, I.M.; DAI, H.; ZHENG, W.; CAO, F.; ZHANG, G.; SUN, D.; WU, F. Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley**. Plant Physiology and Biochemistry**,New Delhi, v.63, p.49–60, 2013.

ALFANO, J.R.; COLLMER, A. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. **The Plant Cell,** Rockville, n.8, p.1683–1698, 1996.

ALMEIDA, C.M.A.; SILVA, T.D.; MALAFAIA, C.B.; AMARAL, D.O.J.; ARRUDA, I.R.S.; BRITO, G.G.; DONATO, V.M.T.S.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Proteomic and physiological analysis of response to water deficit in sugarcane. **Wudpecker Journal of Agricultural Research**, Victoria Island, v.2, n.1, p.001 - 007, 2013.

ANDERSEN, J. L.; KORNBLUTH, S. The Tangled Circuitry of Metabolism and Apoptosis. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 49, n.3, p.399-410, 2013.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P.F.; LOW, P.S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. **Plant Physiology,** Washington**,** v.90, p.109-116, 1989.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** , Palo Alto, v.50, p.601–639, 1999.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.104, p.280-292, 1998.

BAEK, D.; NAM, J.; KOO, Y. D.; KIM, D. H.; LEE, J.; JEONG, J.C.; KWAK, S.S.; CHUNG, W.S.; LIM, C.O.; BAHK, J.D.; HONG, J.C.; LEE,S.Y.; KAWAI-YAMADA, M.; UCHIMIYA, H.; YUN, D.J. Bax-induced cell death of Arabidopsis is meditated through reactive oxygen-dependent and -independent processes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.56, p.15–27, 2004.

BARRS, H.D.; WEATHERLEY, P.E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v.15, p.413-428, 1962.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v.24, n.1, p.23-58, 2005.

BASAÑEZ, G.; SOANE, L.; HARDWICK, J.M. A New View of the Lethal Apoptotic Pore. **PLoS Biology,** San Francisco, v.10, n.9, 2012.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, The Hague, v.39, p.205-207, 1973.

BECHTEL, W.; BAUER, G. Catalase protects tumor cells from apoptosis induction by intercellular ROS signaling. **Anticancer Research,** Kapandriti,v.29, n.11, p.4541-57, 2009**.**

BEGCY, K.; MARIANO, E. D.; GENTILE, A.; LEMBKE, C.G.; ZINGARETTI, S.M.; SOUZA, G.M.; MENOSSI, M. A Novel Stress-Induced Sugarcane Gene Confers Tolerance to Drought, Salt and Oxidative Stress in Transgenic Tobacco Plants. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, n.9, 2012.

BHATT, D.; SAXENA, S.C.; JAIN, S.; DOBRIYAL, A. K.; MAJEE, M.; ARORA, S. Cloning, expression and functional validation of drought inducible ascorbate peroxidase (Ec-apx1) from *Eleusine coracana*. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v.40, p.1155–1165, 2013.

BIRCH, R.G.; BOWER, R.S.; ELLIOTT, A.R. Highly efficient, 5′-sequence-specific transgene silencing in a complex polyploid**. Tropical Plant Biology,** New York, v.3, n. 2, p.88-97, 2010.

BOLDUC, N.; OUELLET, M.; PITRE, F.; BRISSON, L.F. Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. **Planta,** Berlin, v.216, p.377-386, 2003.

BONNEAU, B.; PRUDENT, J.; POPGEORGIEV, N.; GILLET, G. Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: The calcium connection. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research,** Amsterdam, Available online 26 January 2013. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.01.021

BOSABALIDIS, A. M.; KOFIDIS, G. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. **Plant Science**, Limerick, v.163, n.2, p.375–379, 2002.

BOWER, R.; BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant journal : for cell and molecular biology**, Oxford, v.2, n.3, p.409-416, 1992.

BOYER, J.S. Plant productivity and environment. **Science,** New York, v.218, p.443–448, 1982.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p. 248-254, 1976.

BREUSEGEM, F.V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science,** Limerick, v.161, p.405-414, 2001.

BULTYNCK, G.; KIVILUOTO, S.; HENKE, N.; IVANOVA, H.; SCHNEIDER, L.; RYBALCHENKO, V.; LUYTEN, T.; NUYTS, K.; BORGGRAEVE, W.; BEZPROZVANNY, I.; PARYS, J.B.; SMEDT, H.; MISSIAEN, L.; METHNER, A. The C terminus of Bax inhibitor-1 forms a Ca^{2+-} permeable channel pore. **The journal of biological chemistry,** Bethesda, v. 287, n. 4, p. 2544-57, 2012.

CARLIN, S.D. **Mecanismos fisiológicos de cana-de-açúcar sob efeito da interação dos estresse hídrico e ácido no solo**. 2009. 118 p. Dissertação (Doutorado). Universidade estadual Paulista "JULIO DE MESQUITA FILHO", Jaboticabal, 2009.

CESNICK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento de cana-de-açúcar.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 307p.

CHAE, H.J.; NING, K.E.; KIM, H.-R.; SHAORONG, C.; GODZIK, A.; DICKMAN, M. REED, J.C. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by *Bax inhibitor-1* homologs from animals, plants, and yeast. **Gene,** Philidelphia, v.323, p.01-113, 2003.

CHAE, H. J.; KIM H.R.; XU, C.; MAITRE B.B.; KRAJEWSKA, M.; KRAJEWSKI S.; BANARES S.; CUI, J.; DIGICAYLIOGLU, M.; KE, N.; KITADA, S.; MONOSOV, E.; THOMAS,M.; KRESS,C.L.; BABENDURE, J.R.; TSIEN, R.Y.; LIPTON, S.A.; REED, J.C. BI-1 Regulates an Apoptosis Pathway Linked to Endoplasmic Reticulum Stress. **Molecular Cell**, Cambridge, v.15, n.3, p.355–36613, 2004.

CHUGH, V.; KAUR, N.; GUPTA, A.K. Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (Zea mays L.) seedlings in response to drought. **Indian. Journal Biochemistry. Biophysics,** Ludhiana, v.48, n.1, p.47-53, 2011.

CIA, M.C. Resposta antioxidativa em variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.)* sob déficit hídrico. 2010. 90p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

CIDADE, D.A.P.; GARCIA, R.O.; DUARTE, A.C.; SACHETTOS-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.3, p.385-391, 2006.

COLL, N.S.; P EPPLE, P.; DANGL, J.L. Programmed cell death in the plant immune system. **Cell Death and Differentiation,** London**,** v.18, p.1247–1256, 2011.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar safra 2012/2013, terceiro levantamento, dezembro/2012. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília: Conab, 2012,18p. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_cana_portugues_12_2012.pdf/>. Acesso em 21 jan. 2013.

COSTA, M.D.B.L. **Estresse osmótico e do retículo endoplasmático induzem morte celular programada de maneira independente das proteínas NRPs**. 2007. 92p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.

CRISTOFOLETTI-JUNIOR, S.C. **Fisiologia da emergência e perfilhamento em mini-toletes de variedades de cana-de-açúcar.** 2012. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de concentração: em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York:Columbia University Press, **,** 1981. 1262p.

DANGL, J.F.; DIETRICH, R.A.; THOMAS, H. Senescence and Programmed Cell Death. In: BUCHNAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.** Rockville, Maryland:ASP Press, 2000. chap. 20, p. 1044-1101.

DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S, J. Cell Death: Critical Control Points. **Cell**, Cambridge, v.116, n. 2, p.205–219, 2004.

DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, London, v.394, p.585–588, 1998.

DICKMAN, M.B.; PARK, Y.K.; OLTERSDORF, T.; LI, W.; CLEMENT, T.; FRENCH, R. Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.98, p.6957-6962, 2001.

DOMÍNGUEZ, F.; CEJUDO, F.J A comparison between nuclear dismantling during plant and animal programmed cell death. **Plant Science,** Limerick, v.197, p.114–121, 2012.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, Mullica Hil, v.35, p.495–516, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. A expansão da cana-de-açúcar e sua sustentabilidade. Disponível em: < http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2008/A%20expansao%20da%20cana-de-acucar%20e%20a%20sua%20sustentabilidade.pdf >. Acesso em 21 jan. 2012.

ESTEVES, B.S.; SUZUKI, M.S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, Campos dos Goytocazes v.12, p. 662-679, 2008.

FARRANT, J.M. MOORE, J.P. Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. **Current Opinion in Plant Biology,** Amsterdam**,** v. 14, p.340–345, 2011.

FEUERSTEIN G.; ROBERT JUNIOR, R.R.; YUE,T. L. Apoptosis and Congestive Heart Failure. **Trends in Cardiovascular Medicine**, Boston, v. 7, n. 7, p. 249–255, 1997.

FICHT ; M.; DE LA CRUZ, A.; MOORE, P. Effectiveness of different selection markers for sugarcane transformation. In: RAZA, G.; ALI. K.; MUKHTAR, Z.; MANSSOR, S.; ARSHAD, M,; ASADA, S. The response of sugarcane (*Saccharum officinarum L*) genotypes to callus induction, regeneration and different concentrations of the selective agent (geneticin - 418). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n.51, p. 8739-8747, 2010.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Annals of Botany**, London, v.89, n.2, p.183-189, 2002.

FLOR, H.H. Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. **Phythopatology,** St. Paul, v.45, p. 680- 685, 1955.
FOYER, C.H.; LELANDAIA, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum,** Copenhagen**,** v.92, p.696-717, 1994.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist,** Cambridge, v.146, n.3 p.359-388, 2000.

FRANCIS, C.A.; RUTGER, J.N. PALMER, A.F.E. A rapid method for plant leaf area estimation in maize (*Zea mays L.*) **Crop Science**, Madison, v.9, p.537-539, 1969.

FUJIKAWA, T.; ISHIHARA, H.; LEACH, J.E.; TSUYUMU, S. Suppression of defense response in plants by the avrBs3/pthA gene family of *xanthomonas* spp. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.19, p.342–349, 2006.

GADJEV, I.; STONE, J.M.; GECHEV, T.S. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. **International Review of Cell and Molecular Biology**, Cambridge, v.270, p.88-129, 2008.

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J.E. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the *bar* gene. **Crop Science**, Madison, v.36, n. 5, p. 1367-1374, 1996.

GASCHO, G.J.; SHIH, S.F. Sugarcane. In: TEARE, I.D.; PEET, M.M. **Crop water relations.** New York: John Wiley, 1983. cap. 14, p.445-479.

GHANNOUM, O.; CONROY, J.P.; DRISCOLL, S.P.; PAUL, M.J.; FOYER, C.H.; LAWLOR, D.W. Non-stomatal limitations are responsible for drought-induced photosynthetic inhibition in four C_4 grasses. **New Phytologist**, Cambridge, v.159, p.835–844, 2003.

GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany,** London, v.103, n.4, p.635-644, 2009.

GONZALEZ, A.; MARTIN, I.; AYERBE, L. Yield and osmotic adjustment capacity of barley under terminal water-stress conditions. **Journal of Agronomy and Crop Science,** New York, v.194, p.81-91, 2008.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a litte easier. **Functional Plant Biology**, Victoria, v.5, n.2, p.1222-127, 2005.

GRAÇA, J. P.; RODRIGUES, F. A.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ZINGARETTI, S. M. Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 22, n.3, p.189-197, 2010.

GRESSEL, J.; GALUN, E. Genetic controls of photooxidant tolerance. In: FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P.M.; (Ed.) Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plant. Boca raton, CRC Press, 1994. p. 237–274

GRZMIL, M.; THELEN, P.; HEMMERLEIN, B.; SCHWEYER, S.; VOIGT, S. Bax inhibitor-1 is overexpressed in prostate cancer and its specific down-regulation by RNA interference leads to cell death in human prostate carcinoma cells. **The American Journal of Pathology,** Bethesda, v.163, p.543–552, 2003.

GUAN, Q.; TAKANO, T.; LIU, S. Genetic Transformation and Analysis of Rice OsAPx2 Gene in Medicago sativa. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, p.7, 2012.

GUO, M.; TIAN, F.; WAMBOLDT, Y.; ALFANO, JR. The majority of the type III effector inventory of pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 can suppress plant immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** Saint Paul, v. 22, p.1069–1080, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford, **University Press**., 1989. 346p.

HAMEED, A.; BIBI, N.; AKHTER, J.; IQBAL, N. Differential changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v.49, n.2, p.178–185, 2011.

HAMMERSCHIMIDT, R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 285-306, 1999.

HEATH, M.C. Hypersensitive response-related death. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, p. 321-334, 2000.

HENKE, N.; DMITRIJ A.L.; LARS, S.; HABICHT, J.; PERGANDE, M.; METHNER, A. The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1. **Cell Calcium**, Edinburgh, v.50, n.3, 2011.

HEUER, B. Osmoregulatory role of proline in water and saltstressed plants. In: Pessarakli,M.(Ed.). **Handbook of Plant and Crop Stress,** New York:Marcel Dekker. 1994. p.363–381.

HOEBERICHTS, F.A.; WOLTERING, E.J. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell mechanism and plantspecfic regulators. **Bioessays**, Cambridge, v.25, p. 47-57, 2003.

HOLTMAN, W.L.; HEISTEK, J.C.; MATTERN, K.A.; BAKHUIZEN, R.; DOUMA, A.C. Beta-oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in embryo of germination barley,. **Plant Science**, Limerick, v. 99, n. 1, p. 43-53, 1994.

HOFIUS, D.; SCHULTZ-LARSEN, T.; JOENSEN, J.; TSITSIGIANNIS, D.I.; NIKOLAJ H.T.; PETERSEN, N.H.T; MATTSSON, O.; JORGENSEN, L.B.; JONES, J.D.G.; MUNDY, J; MORTEN, PETERSEN, M. Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in Arabidopsis. **Cell**, Cambridge, v.137, n. 4, p.773-83, 2009.

HSIAO, T.C. Plant responses to water stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.24, p. 519-570, 1973.

HU, W.; HUANG, C.; DENG, X.; ZHOU, S.; CHEN, L.; LI, Y.; WANG, C.; MA, Z.; YUAN, Q.; WANG,Y.; CAI, R.; LIANG, X.; YANG, G.; HE, G. TaASR1, a Transcription Factor Gene in Wheat, Confers Drought Stress Tolerance in Transgenic Tobacco1. Article first published online: 28 Feb 2013, DOI: 10.1111/pce.12074

HUCKELHOVEN, R.; DECHERT, C.; KOGEL, K.H. Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of *mlo*-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. **Plant Biology,** Stuttgart, v.100, n. 9, p.5555–5560, 2003.

IGAMBERDIEV, A.U.; LEA, P.J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of fotosynthetic organism, **Phytochemistry**, New York, v. 60, n.7, p.651-674, 2002.

IHARA-OHORI, Y.; NAGANO, M.; MUTO, S.; UCHIMIYA H.; KAWAI-YAMADA, M. Cell Death Suppressor Arabidopsis Bax Inhibitor-1 Is Associated with Calmodulin Binding and Ion Homeostasis. **Plant Physiology**, Washington, v. 143, p. 650–660, 2007

IJAZ, S.; RANA, I.A.; KHAN I.A.; SALEEM, M. Establishment of an in vitro regeneration system for genetic transformation of selected sugarcane genotypes. **Genetics and Molecular Research,** on line journal, v.11, n.1, p.512-530, 2012.

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

ISBAT, M.; ZEBA, N.; KIM, S.R.; HONG, C.B. A BAX inhibitor-1 gene in Capsicum annuum is induced under various abiotic stresses and endows multi-tolerance in transgenic tobacco. **Journal of Plant Physiology,** Stuttgart, v. 166, p. 1685–1693, 2009.

ISHIKAWA, T.; WATANABE, N.; NAGANO, M.; KAWAI-YAMADA, M.; LAM, E. Bax inhibitor-1: a highly conserved endoplasmic reticulum-resident cell death suppressor. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 18, p.1271–1278, 2011.

JAMIR, Y.; GUO, M.; OH, H.S.; PETNICKI-OCWIEJA, T.; CHEN, S.; TANG, X.; DICKMAN, M.B.; COLLMER, A.; ALFANO, J.R. Identification of pseudomonas syringae type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. **Plant journal : for cell and molecular biology**, Oxford, v. 37, p.554–565, 2004.

JIANG, M.; ZHANG, J. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. **Journal Of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.2401-2410, 2002.

JONES, J.D.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature,** London, v. 444, p. 323–329, 2006.

JU, H.W.; MIN, J.H.; CHUNG, L.S.; KIM C.S. The *atrzf1* mutation of the novel RING-type E3 ubiquitin ligase increases proline contents and enhances drought tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Science,** Limerick, v. 203-204, p. 1-7, 2013.

KAUSAR, R.; HOSSAIN, Z.; MAKINO, T.; KOMATSU, S. Characterization of ascorbate peroxidase in soybean under flooding and drought stresses. **Molecular Biology Reports,** Dordrecht, v.39, p.10573–10579, 2012.

KAWAI, M.; PAN, L.; REED, J.C.; UCHIMIYA, H. Evolutionally conserved plant homologue of the bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing bax-induced cell death in yeast. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 464, p.143– 147, 1999.

KAWAI-YAMADA, M.; JIN, L.; YOSHINAGA, K.; HIRATA, A.; UCHIMIYA, H. Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis Bax Inhibitor-1*. **Plant Biology,** Stuttgart, v.98, p.12295–12300, 2001.

KAWAI-YAMADA, M.; OHORI, Y.; UCHIMIYA, H. Dissection of *Arabidopsi*s Bax inhibitor-1 suppressing Bax, hydrogen peroxide and salicylic acid-induced cell death. **Plant Cell**, Rockville, v.16, p. 21–32, 2004.

KAWAI-YAMADA, M.; HORI, Z.; OGAWA, T.; IHARA-OHORI, Y.; TAMURA, K.; NAGANO, M.; ISHIKAWA, T.; UCHIMIYA, H. Loss of calmodulin binding to Bax inhibitor-1 affects Pseudomonas-mediated hypersensitive response-associated cell death in Arabidopsis thaliana. **The journal of biological chemistry,** Bethesda, v.284, p.27998–28003, 2009.

KELLING, C. R. S. **Efeito da disponibilidade de água no solo sobre os componentes do balanço hídrico e o rendimento do feijoeiro.** 1995. 91p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1995.

KISHOR, P.B. K.; HONG, Z.; MIAO, G.H.; HU, C.A.A; VERMA, D.P.S. Overexpression of Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology,** Rockvile, v.108, p.1387-1394, 1995.

KISHOR, P. B. K.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; LAXMI, P. S.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, Bangalore, v. 88, n. 3, 2005.

KOUWENBERG, L. L. R.; KÜRSCHNER, W. M.; VISSCHER, H. Changes in stomatal frequency and size during elongation of *Tsuga heterophyla* Needles. **Annals of Botany**, London, v. 94, p. 561-569, 2004.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic Press, 1995. 495p.

KRAUS, T.E.; MCKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity.**Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.145, p.570-576, 1995.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, London, v.16, p.3–11, 2009.

KUMAR, D.; YUSUF, M. A.; SINGH, P.; SARDAR, M.; SARIN, N.B. Modulation of antioxidant machinery in α-tocopherol-enriched transgenic *Brassica juncea* plants tolerant to abiotic stress conditions. **Protoplasma,** DOI 10.1007/s00709-013-0484-0, 2013.

LACOMME, C.; SANTA CRUZ, S. Bax- induced cell death in tabacco is similar to hypersensitive response. **Cell Biology,** London, v. 96, p. 7956-9061, 1999.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.L.P.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Sugarcane Biotechnology: the Challenges and Opportunities**. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** , Columbia, v.41, p.345-363, 2005.

LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature,** London, v. 411, n. 6839, p. 848-853, 2001.

LAM, E. Controlled cell death, plant survival and development. **Nature reviews Molecular Cell Biology,** London, v. 5, p. 305-315, 2004.

LAM, E. Programmed cell death in plants: Orchestrating an intrinsic suicide program within walls. **Critical Reviews in Plant Sciences,** New Brunswick, v. 27, p.413-423, 2008.

LARCHER, W. A Planta sob Déficit. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa Artes e Textos, 2000. p.341-478.

LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment,** New York, v. 25, p. 275–294, 2002.

LEE, G.H.; KIM, H.K.; CHAE, S.W.; KIM, D.S.; HA, K.C. ET AL. Bax inhibitor-1 regulates endoplasmic reticulum stress-associated reactive oxygen species and heme oxygenase-1 expression. **The Journal of Biological Chemistry,** Bethesda, v. 282, p.21618–21628, 2007.

LLAMBI, F.; MOLDOVEANU, T.; TAIT, S.W.; BOUCHIER-HAYES, L.; TEMIROV, J.; MCCORMICK, L.L.; DILLON, C.P.; GREEN, D.R. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 44, 517–531, 2011.

LUDLOW, M.M. Ecophysiology of C4 grasses.In: LANGE, O.L.; KAPPEN, L.; SCHULZE, E.D. (Ed.) **Water and plant life**. Problems and modern aproach. Berlin:Springer-Verlag**,**1976.. 1976. p. 364-386. (Ecological studies, 19).

LUKASIK, E.; TAKKEN, F.L. Standing strong, resistance proteins instigators of plant defence. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v.12, p.427–436, 2009.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidases isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant & Cell Physiology,** Kyoto, v.13, p.1091-1101, 1972.

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; GAILLE, C.; KULL. B.; HAAS, D.; REIMMAN, C. Manipulation of salycilate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salycilate syntase**. Plant journal: For cell and molecular biology**, Oxford, v. 25, p. 67-77, 2001.

MAYBANK, J.; BONSAL, B.R.; JONES, J.; LAWFORD, R.G.; O'BRIEN, E.G.; RIPLEY, E.A.; WHEATON, E. Drought as a natural disaster. **Atmosphere-Ocean**, Downsview, v.33, p.195–222, 1995.

MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 31, p. 1-9, 2004.

MELOTTO-PASSARIN. **Transformação genética de cana-de-açucar pro biolística e Agrobaceterium tumefaciens visando estudar o mecanismo de morte celular programada.** 2009.147p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz-"Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MENOSSI, M.; SILVA-FILHO, M.C.; VICENTZ, M.; VAN-SLUYS, M.A.; SOUZA, G.M. Sugarcane functional genomics: gene Discovery for agronomic trait development. **International Journal of Plant Genomic**, Chicago, v.2008, p.1-11, 2007.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science,** Oxorfd, v.7, n.9, p.405-410, 2002.

MITTLER, R; BLUMWALD, E. Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 443-462, 2010.

MITSUHARA, I.; UGAKI, M.; HIROCHIKA, H.; OHSHIMA, M.; MURAKAMI, T.; GOTOH, Y.; KATAYOSE, Y.; NAKAMURA, S.; RYOSO, H.; NISHIMIYA, S.; UENO, K.; MOCHIZUKI, A.; TANIMOTO, H.; TSUGAWA, H.; OTSUKI, Y.; OHASHI, Y. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 7, p.49–59, 1996.

MELOV, S.; RAVENSCROFT, J.; MALIK, S.; GILL, M.S.; WALKER, D.W.; CLAYTON, P.E.; WALLACE, D.C.; MALFROY, B.; DOCTROW, S.R.; LITHGOW, G. Extension of Caenorhabditis elegans lifespan with synthetic superoxide dismutase/catalase mimetics. **Science**, New York, v. 289, p. 1567-1569, 2000.

MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** Palo Alto**,** v. 52, p.561-91, 2001.

MOORE, P.H. Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: towards developing an understanding of the gene-to-crop continuum. **Field Crops Research,** Amsterdam, v.92, p.119-135, 2005.

MOORE, P.H.; MARETZKI, A. Sugarcane. In: ZAMSKI, E.; SCHAFFER, A.A. (Ed.) **Photoassimilate distribution en plants and crops**, New York, 1996. p.643-669.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum,** Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

NAKANO, Y.; ASADA, K.. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**,Oxford, v. 22, p. 867-880, 1981.

NIMCHUCK, Z.; EULGEM, T.; HOLT, B.F. DANGL, J.L. Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review of genetics,** Palo Alto, v. 37, p. 579-609, 2003.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.49, p.249-279, 1998.

OMIRULLEH, S.; ABRAHAM, M.; GOLOVKIN, M.; STEFANOV, I.; KARABAEV, M.K.; MUSTARDY, L.; MOROCZ, S.; DUDITS, D. Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. **Plant Molecular Biology,** Dordrecht, v.21, p.415–428, 1993.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nature Reviews Molecular Cell Biology ,** London**,** v.4, p.552-565, 2003.

PALL, P.; ALLEN. M.; STONE, D. Testing the Clausius-Clapeyron contrain on changes in extreme precipitation under CO2 warming, **Climate Dynamics**, Berlim, v.28, n.4, p.351-368, 2007.

PALLAVAN-UNSAL, N.; BUYUKTUNCER, E.; TUFEKCI, M.A. Programmed cell death in plants. **The plant journal for cell and molecular biology,** Turkey, v.4, p.9-23, 2005.

PASSIOURA, J. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. **Journal of Experimental Botany,** Oxford**,** v. 58, p. 113-117, 2007.

PATADE, V.Y.; SUJATA, B.; PENNA, S.;. Transcript expression profiling of stress responsive genes in response to short-term salt or PEG stress in sugarcane leaves. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 3, p. 3311-3318, 2012.

PEI, Z.M.; MUTRATA, Y.; BENNING, G.; THOMINE, S.; KIUSENER, B.; ALLEN, G.J. BRILL, E.; SCHROEDER, J.I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cell. **Nature**, London, v. 406, p.731-734, 2000.

PEIXOTO-JÚNIOR, R.F. **Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssátelites para *Puccinia melanocephala*, agente causador da ferrugem marrom em cana-de-açúcar.** 2011. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

PERGORARO, R. L. **Avaliação do crescimento e produção de óleos essenciais em plantas de *mentha x piperita* l. Var. Piperita (lamiaceae) submetidas a diferentes níveis de luz e nutrição.** 2007. 51p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Rio de Janeiro: Seropédica, Edur, 2004. 191p.

PINCELLI, R. P.; SILVA, M.A. Alterações morfológicas foliares em cultivares de cana-de-açúcar em resposta à deficiência hídrica. **Bioscience. Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 4, p. 546-556, 2012.

POSTEL, S.; KEMMERLING, B. Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, New York**,** v. 20, p.1025–1031, 2009.

QUEIROZ, R.J.B.; SANTOS, D.M.M.; CARLIN, S.D.; MARIN, A.; BANZATTO, D.A.; CAZETTA, J.O. Osmoprotetores em cana-de-açúcar sob efeito da disponibilidade hídrica no solo**. Científica,** Jaboticabal, v.36, n.2, p.107-115, 2008

RAI, A.C.; SINGHA, M.; SHAH, K. Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in ZAT12-transformed transgenic tomato plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v.6, p.108-114, 2012.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, p. 1189-1202, 2004.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 28, p.123-130, 2003.

RHEIN, A. F. L.; SANTOS, D. M. M.; CARLIN, S. D. Atividade da enzima redutase do nitrato e teores de prolina livre em raízes de cana-de-açúcar sob os estresses hídrico e ácido no solo. **Semina:** Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1345-1360, 2011.

RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. **Variedades RB de Cana-de-açúcar**. Hoffmann, H.P. Araras: CCA/UFSCar, 2008. 30p. Disponível em: <http://pmgca.dbv.cca.ufscar.br>. Acesso em: 22 jan. 2012.

RODRIGUES, F.A.; DA GRAÇA, J.P.; LAIA, M.L.; NHANI-JR, A.; GALBIATI, J.A.; FERRO, M.I.T.; FERRO, J.A.; ZINGARETTI, S,M. Sugarcane genes differentially xpressed during water deficit. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research,** Amsterdam**,** v. 55, n.1, p. 43-53, 2011.

ROGERS, H.J. Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers dies? **Annals of Botany,** London, v. 97, p. 309-315, 2006.

RYAN, C.C.; EGAN, B.T. Rust. In: RICAUD, C EGAN, B.T; GILLASPIE JUNIOR, A.G; HUGHES. C.G. **Diseases of sugarcane**. Amsterdam: Elsevier1989. p.189-210.

SACILOTO R.F.Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem Puccinia melanocephala**. 2003. 86p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SALES, C.R.G. **Respostas fisiológicas de dois genótipos de cana-de-açúcar submetidos à deficiência hídrica e à baixa temperatura no sistema radicular.** 2011. 109 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Tecnologia da Produção Agrícola) - Instituto Agronômico, Campinas, 2011.

SAMEJIMA, K.; EARNSHAW, W.C. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis**. Nature Reviews Molecular Cell Biology ,** London, v. 6, p. 677–688, 2005.

SANCHEZ, P.; TORRES ZEBALA, M.; GRANT, B. AtBI-1, a plant homologue of inhibitor-1, suppresses Bax-induce cell death in yeast and is rapidly up regulated during wounding and pathogen challenge. **Plant journal : for cell and molecular biology,** Oxford, v. 21, p. 393-399, 2000.

SANMARTIN, M.; JAROSZEWSKI, L.; RAIKHEL, N.V.; ROJO, E. Caspases. Regulating death since the origin of life. **Plant Physiology,** Washington, v. 137, p. 841-847, 2005.

SANTOS, R.F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental,** Botucatu**,** v.2, n.3, p.287-294, 1998

SATHE, A.V. Nomenclatural revision of the common rust fungus affecting sugarcane. **Current Science**, Bangalore, v. 40, p. 42-43, 1971.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Riberão Preto, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M.; MOZAMBANI, A.E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. (Org.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar.** Piracicaba: Ed. dos autores, 2006, cap 2, p. 19-36.

SHAH K, DUBEY RS. Cadmium alters phosphate level and suppresses activity of phosphorolytic enzymes in germinating rice seeds. **Agronomy &. Crop Science,** New York, v.179, p.35-45, 1997.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMO,I M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany,** Oxford**,** v. 53, p.1305-1319, 2002.

SILVA, M.A.; JIFON, J.L.; SILVA, J.A.G.; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal Plant Physiology,** Londrina, v.19, p.193-201, 2007.

SILVA, M. A.; SILVA, J.A.G.; ENCISO, J.; SHARMA, V.; JIFON, J. Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.65, n.6, p.620-627, 2008.

SINCLAIR, T.R.; MUCHOW, R.C. System analysis of plant traits to increase grain yield on limited water supplies. **Agronomy Journal,** Madison, v. 92, p. 263–270, 2001.

SINGH, S.; REDDY, M.S. Growth, yield and juice quality performane of sugarcane varieties under different soil moisture regimes in relation to drought resistance. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 17., 1980. Manila. **Proceedings…** Manila: ISSCT, 1980. p. 541-555.

SODEK, L. Metabolismo do nitrôgenio. In: KERBAUY, G.B.(Ed.).**Fisiologia vegetal.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 4, p.94-113.

SOLOMON, S.; PLATTNER, G.K.; KUNUTT, R.; FRIEDLINGSTEIN, P. Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions**.PNAS, Environmental Sciences,** Washington, v.16, n.6, p. 1704-1709, 2009.

SOUZA, G. M.; SILVA, A. M. S. Desvendando as vias de transdução de sinal da cana-de-açúcar. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, São Paulo, v.25, p.58-63, 2002.

STEWART, C.R.; BOGGESS, S.F.; ASPINALL, D.; PALEG, L.G. Inhibition of proline oxidation by water stress, **Plant Physiology**, Washington, v.59, p.930-932, 1977

SUZUKI, N.; KOUSSEVITZKY, S.; MITTLER, R.; MILLER, G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, Denton, v. 35, p. 259–270, 2012.

SZEGEZDI, E.; DUFFY, A.; O'MAHONEY, M.E.; LOGUE, S.E.; MYLOTTE, L.A.; O'BRIEN, T.; SAMALI, A. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** Orlando, v. 349, p. 1406–1411, 2006.

SZEGEZDI, E.; MACDONALD, D.C. ; NÍ CHONGHAILE, T.; GUPTA, S.; SAMALI, A. Bcl-2 family on guard at the ER. **American Journal of Physiology - Cell Physiology,** Galway,v. 296, p. 941–953, 2009.

TAMURA, T.; HRA, K.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUMI, N.; SANO, H. Osmotic stress tolerance of transgenic tabacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tabacco plants, **Plant Physiology**, Washington, v.131, n.2, p.454-462, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TERADA, R.; NAKAYAMA, T.; IWABUCHI, M.; SHIMAMOTO, K. A wheat histone H3 promoter confers cell division-dependent and -independent expression of the gus A gene in transgenic rice plants. **Plant journal : for cell and molecular biology,** Oxford, v. 3, p.241–252, 1993.

TITORENKO, V.I.; MULLEN, R.T. Peroxisome biogenesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER. **Journal Cell Biology,**. New York, v.174, p.11–17, 2006.

TSUJIMOTO, Y.; COSSMAN, J.; JAFFE, E.; CROCE, C. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. **Science**, New York, v. 228, p. 1440–1443, 1985.

VAN DILLEWIJN, C. Botany of sugarcane. **Chronica Botanica**, New York, p.371, 1952.

VAN DOORN W.G.; BEERS, E.P.; DANGL, J.L.; FRANKLIN-TONG, V.E.; GALLOIS, P.; HARA-NISHIMURA, I.; JONES, A.M.; KAWAI-YAMADA, M.; LAM, E.; MUNDY. J.; MUR, L.A.J.; PETERSEN, M.; SMERTENKO, A.; TALIANSKY, M.; VAN BREUSEGEM, F.; WOLPERT, T.; WOLTERING, E.; ZHIVOTOVSKY, E.; BOZHKOV, P.V. Morphological classification of plant cell deaths. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 18, p. 1241–1246, 2011.

VAUX D.L.; CORY, S.; ADAMS, J.M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. **Nature,** London**,** v. 335, p. 440–442, 1988.

VENKATARAMANA, S.; RAO, P.N.G.; NAIDU, K.M. The effects of water stress during the formative phase on stomatal resistance and leaf water potential and its relationship with yield in ten sugarcane varieties. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 13, p. 345-353. 1986.

VERMA, D. P. S. Osmotic stress tolerance in plants: Role of proline and sulfur metabolisms. In: SHINOZAKI, K. AND YAMAGUCHI INOZAKI, K.(Ed.). **Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants** R. G Texas: Landes, , 1999. p. 153–168.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F .R. ;KEMPER, E.L. ; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Riberão Preto, v.24, p.1–7, 2001.

VIRTUDAZO, E.V., NOJIMA, 1-1.; KAKISHIMA, M. Phylogenetic analysis of sugarcane rust based on sequences of ITS, 5.8S rDNA and D1/D2 regions ot LSU rDNA. **Journal of General Plant Pathology**, Heidelberg, v. 67, p. 28-36, 2001.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Reviews Genetics,** London**,** v.13, p. 227-232, 2012.

WALTON, J.D. Host-selective toxins: agents of compatibility. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p.1723–1733, 1996.

WANG, S.; LIANG, D.; LI, C.; HAO, Y.; MAA, F.; SHU, H. Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. **Plant Physiology and Biochemistry,** New Delhi, v. 51, p. 81-89, 2012.

WATANABE, N.; LAM, E. *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic type of cell death. **Plant journal : for cell and molecular biology,** Oxford, v. 45, p. 884-894, 2006.

WATANABE, N.; LAM, E. Bax Inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, New Brunswick, v.10, p.3149-3167, 2009.

WILLADINO, L.; OLIVEIRA-FILHO, R.A.; SILVA JUNIOR, E.A; GOUVEIA NETO, A.; CAMARA, T.R. Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidativo e fluorescência da clorofila. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 417-422, 2011.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K.S.; ZHU, J.K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **The Plant Cell**, Rockville, p.165-183, 2002.

XU, Q.; REED, J. C. Bax inhibitor-1. A mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. **Molecular Cell,** Cambridge, v. 1, p. 337–346, 1998.

YORDANOV, I; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought and stress tolerance. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, Special Issue, p. 187–206, 2003.

YOSHINAGA, K.; ARIMURA, S.; HIRATA, A.; NIWA, Y.; YUN, D.J.; TSUTSUMI, N.; UCHIMIYA, H.; KAWAI-YAMADA, M. Mammalian Bax initiates plant cell death through organelle destruction. **Plant Cell Reports**, New York, v. 24, p. 408–417, 2005.

ZABALETA, E.; MARTIN, M.V.; BRAUN, HANS-PETER. A basal carbon concentrating mechanism in plants? **Plant Science**, Limerick, v.187, p.97–104, 2012.

ZHANG, Z.; ZHANG, Q.; WU, J.; ZHENG, X.; ZHENG, S.; SUN, X.; QIU, Q.; LU, T. Gene knockout study reveals that cytosolic ascorbate peroxidase 2(OsAPX2) plays a critical role in growth and reproduction in rice under drought, salt and cold stresses. **PLoS ONE,** San Francisco, v. 8, n. 2, p.1-13, 2013.

ZHAO, D.; GLAZ, B.; COMSTOCK, J.C. Sugarcane response to water-deficit stress during early growth on organic and sand soils. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences,** Florida**,** v. 5, n. 3, p. 403-414, 2010.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.53, p.247–273, 2002.

ZHU, Y.J.; KOMOR, E.; MOORE, P. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. **Plant Physiology,** Washington, v.115, p.609-616, 1997.