

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

BIOTECNOLOGIA EM CANA-DE-AÇÚCAR E  
TOLERÂNCIA À ESTRESSES: ESTUDO DOS GENES DA  
PIROFOSFATASE VACUOLAR E GALACTINOL SINTASE

Biologia Molecular e Bioinformática

Aluna: Jéssica Fernanda Barazetti

Supervisor: Dr. Douglas Silva Domingues

Orientadora: Dra. Patricia da Costa Zonetti

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito parcial para a  
conclusão do CURSO DE  
GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM  
BIOTECNOLOGIA.

PALOTINA - PR  
JULHO – 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

BIOTECNOLOGIA EM CANA-DE-AÇÚCAR E  
TOLERÂNCIA À ESTRESSES: ESTUDO DOS GENES DA  
PIROFOSFATASE VACUOLAR E GALACTINOL SINTASE

Aluna: Jéssica Fernanda Barazetti

Supervisor: Dr. Douglas Silva Domingues

Orientadora: Dra. Patricia da Costa Zonetti

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito parcial para a  
conclusão do CURSO DE  
GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM  
BIOTECNOLOGIA.

PALOTINA – PR  
JULHO – 2013

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE PALOTINA  
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Universidade Federal do Paraná  
Setor Palotina  
Curso de Tecnologia em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso  
Área de Estágio: Biologia Molecular e Bioinformática  
Acadêmica: Jéssica Fernanda Barazetti  
Supervisor do Estágio: Dr. Douglas da Silva Domingues  
Orientadora do Estágio: Dra. Patricia da Costa Zonetti

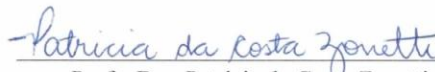
O presente TCC foi apresentado e aprovado pela seguinte banca examinadora:



Profa Dra. Roberta Paulert



Profa Ms. Poliana Schreiner



Profa. Dra. Patricia da Costa Zonetti  
Orientadora

Palotina, PR, 07 de agosto de 2013.

*"Nunca se esqueça de quem você é, porque é certo que o mundo não se lembrará.  
Faça disso sua força. Assim, não poderá ser nunca a sua fraqueza. Arme-se com esta  
lembrança, e ela nunca poderá ser usada para magoá-lo".*

George R.R. Martin

Aos meus pais, Francisco e Clarice, por tudo o que eu sou,  
e por sempre acreditarem em mim, dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

Ao meu supervisor e orientador, Dr. Douglas da Silva Domingues, pela oportunidade, conselhos e por todo conhecimento passado.

À minha orientadora, Dr. Patricia da Costa Zonetti, pela confiança em mim desde sempre, por tudo o que me ensinou, por todas as correções de trabalhos, paciência e dedicação.

Ao Instituto Agrônômico do Paraná, pela oportunidade de estágio.

À Dr. Andrea Akemi, pela oportunidade de auxiliar em seu projeto de transformação genética de cana-de-açúcar, e pela confiança.

Ao pessoal do LBI, por me receberem tão bem, principalmente aqueles que me auxiliaram com o dia-a-dia no laboratório. Em especial ao Rafael Maniero, por toda a ajuda.

Aos meus pais, por serem a minha base acima de tudo, por nunca medirem esforços para me ajudar e por acreditarem nos meus sonhos comigo.

Às minhas irmãs, Vânia e Aline, por nunca me negarem ajuda, em todos os sentidos, e por sempre ficarem do meu lado.

Aos professores do curso, por todo conhecimento passado e por todo o incentivo, em especial as Professoras Luciana, Roberta, Eliane, aos o Professores Nelson, Brenner, Leandro, enfim, todos aqueles que realmente acreditaram em nós.

À minha amiga Fernanda F. de Oliveira, que esteve comigo desde o ensino médio até o estágio, por todas as conversas, conselhos, e por sempre estar do meu lado. É bom ter alguém pra confiar e pra compartilhar minhas vitórias.

Aos meus amigos, em especial Guilherme, Carolini, Mariana L., Mariana A. e Luiz por todas as risadas, todos os momentos, e por tudo que me proporcionaram, sempre me ajudando da melhor forma possível. O que fizeram por mim jamais será esquecido.

A todos que, de alguma forma, colaboraram com a realização deste trabalho, e com a minha formação acadêmica em geral.

Muito obrigada!

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Biossíntese de galactinol, rafinose e estaquiose, em plantas.	7
FIGURA 2 - Relação estrutural dos oligossacarídeos da família das rafinoses, formados a partir de sacarose e adições de galactose.	7
FIGURA 3 - Gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio.	12
FIGURA 4 - Resultados da busca por <i>AtGols</i> no banco de dados TAIR .	13
FIGURA 5 - Resultados obtidos com a comparação de sequências correspondentes ao gene <i>AtGols</i> em cana-de-açúcar.	14
FIGURA 6 - Resultados obtidos com a comparação de sequências correspondentes ao gene <i>Gols</i> encontradas em Sorgo, com o transcriptoma de cana-de-açúcar.	15



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - <i>Loci</i> genômicos correspondentes ao gene <i>Gols</i> em sorgo.	15
--	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 CANA-DE-AÇÚCAR .....	3
2.2 ESTRESSES ABIÓTICOS.....	4
2.3 PIROFOSFATASE VACUOLAR .....	5
2.4 GALACTINOL SINTASE .....	6
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	9
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	9
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	10
4.1 VALIDAÇÃO DE EVENTOS TRANSGÊNICOS CONTENDO O GENE DA PIROFOSFATASE VACUOLAR EM CANA-DE-AÇÚCAR .....	10
4.1.1 Obtenção de plantas transgênicas contendo o gene <i>AVPI</i> .....	10
4.1.2 Extração de DNA e amplificação do gene .....	10
4.1.3 Eletroforese em gel de agarose.....	11
4.2 ESTUDO DO GENE DA GALACTINOL SINTASE.....	11
4.1.1 Busca por genes de galactinol sintase em Cana-de-açúcar .....	11
4.1.2 Busca por genes de galactinol sintase no genoma de Sorgo .....	11
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	12
5.1 VALIDAÇÃO DE EVENTOS TRANSGÊNICOS CONTENDO O GENE DA PIROFOSFATASE VACUOLAR EM CANA-DE-AÇÚCAR.....	12
5.2 ESTUDO DO GENE DA GALACTINOL SINTASE.....	13
5.1.1 Busca por genes de galactinol sintase em Cana-de-açúcar .....	13
5.1.2 Busca por genes de galactinol sintase no genoma de Sorgo .....	15
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	16
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	17

## 1. INTRODUÇÃO

Estresses são fatores prejudiciais à planta, e que dependendo do tipo e da severidade, podem não apenas afetar a produtividade vegetal, como também levar a planta à morte. As plantas possuem um sistema de tolerância à estresses, e essa aclimatação envolve um processo integrado de eventos que incluem vários níveis de organização.

O estresse hídrico é, de um modo geral, um dos estresses que mais afetam o desenvolvimento dos vegetais. Assim como a maioria dos estresses, os prejuízos às plantas submetidas à seca podem variar de intensidade dependendo do estágio de desenvolvimento em que se encontram. Do mesmo modo, a reação da planta ao estresse hídrico também depende do órgão em questão, e as respostas celulares são específicas e peculiares para cada órgão (ALMEIDA; LEITE; SOUZA, 2005). O estresse hídrico pode ainda se agravar em condições de solos salinos, o que prejudica o equilíbrio osmótico, uma vez que soluções salinas retém água, reduzindo o potencial hídrico.

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do setor agrícola brasileiro, e sua expansão foi primeiramente motivada pelo Proálcool, na década de 70. Hoje, a busca por fontes energéticas alternativas ao petróleo dá a cana-de-açúcar um significado na economia ainda maior devido ao seu principal produto, o etanol. O Brasil vem ganhando destaque na produção de álcool, açúcar e outros co-produtos derivados da cana, porém, ainda carece de soluções tecnológicas que otimizem a produção, a fim de aumentar a produtividade e baratear custos.

Dentre os principais pontos que caracterizam a distribuição geográfica e o perfil da cultura de cana-de-açúcar estão as influências climáticas, sendo que o controle de estresses abióticos é uma das maiores dificuldades atuais na produção de cana. Esses estresses interferem negativamente no crescimento e desenvolvimento vegetal, e entre os mais prejudiciais ao desenvolvimento da cana, estão os estresses hídrico e salino. Assim como todos os vegetais, a cana também possui algumas formas de se proteger dos estresses, porém, dependendo da severidade suas defesas naturais não são suficientes. Neste contexto a biotecnologia e o melhoramento vegetal, podem modificar as respostas naturais de plantas a estresses aumentando sua intensidade, modificando sua indução, ou até mesmo, adicionando defesas não existentes naturalmente.

Em seus levantamentos da produção de cana-de-açúcar no Brasil, a Conab verificou que períodos de estiagens provocam uma drástica redução da produtividade. Levando em

consideração o atual período de desenvolvimento em que o país se encontra, e a importância da cana para o setor agroindustrial, situações como essa podem repercutir por anos.

A tolerância a estresses é um fator fundamental quando se pensa em plantas cultiváveis. Para a cana-de-açúcar, algumas moléculas já foram mencionadas por possuírem relação com alguns tipos de estresses. Um exemplo é o acúmulo de açúcares solúveis, como os oligossacarídeos da família das rafinoses (em inglês *Raffinose Family Oligosaccharides* – RFO), ou outros solutos orgânicos, como a prolina e outros aminoácidos.

Os RFO possuem várias funções nas plantas, dentre elas o transporte de carboidratos, e proteção contra estresses bióticos e abióticos. A biossíntese desses oligossacarídeos inicia-se pela formação de galactinol pela ação da enzima galactinol sintase (Gols) (SUN *et al.*, 2008), cujo gene é um dos focos deste trabalho.

Outra molécula relacionada com tolerância à estresses em plantas é a H<sup>+</sup>ATPase pirofosfatase vacuolar (V-H<sup>+</sup>PPase), uma bomba eletrogênica específica da membrana do vacúolo que, diferentemente das H<sup>+</sup>ATPases da membrana plasmática, sua hidrólise não forma um intermediário fosforilado. Muitos resultados já foram encontrados relacionando a superexpressão do gene que codifica a V-H<sup>+</sup>PPase, o AVP1, com a tolerância de plantas à estresse salino e hídrico, porém sua função na planta em situação de estresse, ou os eventos fisiológicos e bioquímicos decorrentes ainda são desconhecidos (PASAPULA *et al.*, 2011).

O Laboratório de Biotecnologia Vegetal (LBI) do IAPAR já possui trabalhos com genes de tolerância a estresses abióticos. Um envolvendo o gene de produção de prolina (*P5CS*), utilizado para transformação em cana-de-açúcar (MOLINARI *et al.*, 2007), e outro com o gene da galactinol sintase (*Gols*) em café (SANTOS *et al.*, 2011).

Com o objetivo de estudar os genes *AVP1* e *Gols*, relacionados com a capacidade de tolerância da cana-de-açúcar à estresses, este estágio caracterizou-se como pesquisa científica, sendo desenvolvido nas dependências do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (LBI) do IAPAR (Londrina-PR), com período de três meses, totalizando 360 horas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar se tornou umas das principais culturas do setor primário brasileiro, e sua produção cresce desde sua introdução no país. Atualmente, a cultura abrange vários estados do Brasil, e a produção nacional pode ser dividida entre região Centro-Sul e Norte. Os maiores produtores são os estados de São Paulo, Minas Gerais, e Paraná, respectivamente. O Paraná, hoje, é o maior produtor da região Sul, responsável por cerca de 99% da produção regional (ÚNICA, 2013).

A cultura pertence ao gênero *Saccharum* L. (Poaceae) e dentro desse gênero existem pelo menos seis diferentes espécies. A espécie cultivada atualmente é um híbrido entre *Saccharum officinarum* e *S. spontaneum*, recebendo a denominação de *Saccharum* spp. (TOPPA *et al.*, 2010).

O interesse econômico na produção de cana-de-açúcar tem aumentado significativamente devido à sua importância como fonte de energia renovável através de seu produto principal, o etanol. Foi a produção brasileira de cana que consolidou o uso deste biocombustível como alternativa ao petróleo, e estima-se que a produção nacional dobre na próxima década, a fim de atender a crescente demanda mundial (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011).

Em seus levantamentos anuais, a Conab avalia, juntamente com os dados de produção e produtividade, as influências climáticas, a fim de muitas vezes justificar os resultados obtidos. Em alguns de seus levantamentos, cujas produtividades não atingiram as expectativas, ela constatou uma deficiência hídrica na maioria das regiões produtoras (CONAB, 2013).

Além de valores de produtividade da cultura, outro fator com relação à produção de cana-de-açúcar também precisa ser considerado, a maturação. Além da quantidade produzida, é necessário ater-se à qualidade da matéria-prima, que neste caso, está intimamente ligada com a fase de maturação da cana, correspondente ao acúmulo de sacarose no colmo. Para ser considerada madura e atender aos requisitos industriais, é necessário que a planta tenha um teor maior que 12% de sacarose por peso de colmo, e essa exigência reflete a qualidade do produto final. Essa é a fase, portanto, que condições ambientais ótimas são necessárias, e que estresses devem ser minimizados, a fim de atender às exigências nutricionais e ambientais da planta (ALMEIDA; LEITE; SOUZA, 2005).

A cana-de-açúcar ainda não possui seu genoma sequenciado, porém possui um grande banco de dados de transcriptoma. Os conjuntos de *EST* de cana-de-açúcar disponíveis publicamente foram montados em tentativas de sequências consenso (TC's), e estão disponíveis no *Sugarcane Gene Index*, disponível em (<http://compbio.dfci.harvard.edu>). Para análises comparativas, o sorgo, que já possui seu genoma sequenciado, é a planta mais próxima, levando em consideração a alta colinearidade com o transcriptoma da cana. Outra planta também utilizada para comparações genéticas com cana-de-açúcar é o arroz (VICENTINI *et al.*, 2012).

## 2.2 ESTRESSES ABIÓTICOS

Segundo Taiz e Zeiger (2004), estresse pode ser definido como um fator que exerce uma influência prejudicial para a planta, e segundo eles a compreensão destes estresses, bem como a adaptação e as consequências geradas às plantas é de grande importância não apenas para a agricultura, mas também para o meio ambiente em geral. De acordo com Santos (2008), os estresses podem ser divididos, em função da natureza do agente estressante, em bióticos (como doenças ou pragas) e abióticos (fatores ambientais, como seca e salinidade).

Dentre os estresses que mais influenciam no desenvolvimento vegetal em geral, está o estresse hídrico. Ele acarreta prejuízos à planta de diversas formas, afetando várias funções fisiológicas, por exemplo, a condutância estomática, transpiração, fotossíntese líquida e a eficiência no uso da água (GONÇALVES *et al.*, 2010).

Nas regiões tropicais, além da deficiência hídrica em alguns períodos do ano, outro estresse abiótico muito preocupante atualmente é o salino, uma vez que parte do território brasileiro possui solos com alta salinidade. O sal em excesso provoca diversas respostas fisiológicas nas plantas, como a síntese e translocação de hormônios, por exemplo. Além disso, a grande quantidade de sal interfere nas propriedades químicas e físicas do solo, pois aumenta a espessura da dupla camada iônica difusa, reduzindo assim sua porosidade e permeabilidade. Isso gera um estresse hídrico, pois mesmo com a presença de água no solo, o sal em excesso dificulta a absorção desta pelas raízes (TÁVORA; FERREIRA; HERANDEZ, 2001).

Os estresses geralmente são estudados e caracterizados em estudos de um único estresse, porém em condições de campo muitas vezes ocorre a interação entre mais de um tipo de estresse. Tal situação maximiza os efeitos deletérios causados por cada estresse

individualmente, o que leva a respostas fisiológicas mais severas, e a alterações específicas na expressão gênica (SILVA *et al.*, 2012)

As plantas respondem às situações de estresses de várias formas, incluindo processos fisiológicos e alterações na expressão gênica. Em cana-de-açúcar, por exemplo, alguns autores verificaram que as situações de estresse hídrico influenciam na atividade de enzimas-chave em termos fisiológicos, como a nitrato redutase (CARLIN; RHEIN; SANTOS, 2012).

Muitas moléculas possuem papéis fundamentais para as plantas em situações de estresse. Várias proteínas, enzimas e outras moléculas já foram descritas, tendo um papel direto na regulação fisiológica da planta, ou indireto, induzindo a expressão de outras enzimas e moléculas importantes (TAJI *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de variedades mais tolerantes a estresses, e que mantenham sua produtividade mesmo em situações extremas, tem sido um dos principais focos de estudo da biotecnologia vegetal, uma vez que tais estudos e tecnologias são de extrema importância para a sustentabilidade da agricultura moderna (SANTOS, 2008).

Várias tecnologias para a identificação de genes que participem dos processos fisiológicos de adaptação a estresses, bem como as estratégias dessas respostas já são compreendidas e utilizadas. Porém, o maior desafio agora é compreender como estes genes atuam, ou melhor, quando e de que forma eles são expressos (BOHNERT *et al.*, 2006).

### 2.3 PIROFOSFATASE VACUOLAR

Uma forma de melhorar ou incrementar a tolerância de plantas aos estresses salino e hídrico é aumentar a concentração de soluto nos vacúolos das células, a fim de aumentar a pressão osmótica. Com isso, diminui-se o potencial hídrico da célula, aumentando a entrada de água, ou evitando sua perda (PASAPULA *et al.*, 2011).

A pirofosfatase vacuolar (V-H<sup>+</sup>-PPase) é uma bomba de prótons semelhante a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática, porém, só ocorre em plantas, uma vez que gera um gradiente transmembranar para o interior do lúmen do vacúolo e também cisternas do Golgi (TAIZ; ZEIGER, 2004). A pirofosfatase vacuolar, como o próprio nome indica, é uma ATPases tipo P, ou seja, é fosforilada, e essa característica dá a ela a capacidade de desempenhar outras funções além das suas funções básicas, como tolerância a sal, regulação do pH intracelular e expansão celular (MORSOMME; BOUTRY, 2000).

O gene da pirofosfatase vacuolar, *AVPI* (*Arabidopsis vacuolar pyrophosphatase*) (SARAFIAN *et al.*, 1992) tem sido descrito como um dos mais promissores para

melhoramento vegetal visando tolerância a estresses hídricos e salinos. Uma vez que uma das formas de atuação dessa enzima é justamente o acúmulo de solutos celulares, ela já foi relacionada com vários processos envolvidos na adaptação a estresses. A superexpressão de *AVPI* poderia melhorar de forma significativa a tolerância à seca e sal em plantas de *Arabidopsis* transgênicas. Mais tarde, quando este gene foi introduzido em tomate e arroz, foram observados fenótipos tolerantes semelhantes (GAXIOLA *et al.*, 2001).

Estudos acerca da superexpressão do gene da V-H+PPase em *Arabidopsis* mostraram um aumento de divisões celulares no início da formação do organismo, elevação do transporte de auxina, e diminuição da quantidade e atividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática (GAXIOLA *et al.*, 1999). A superexpressão de uma pirofosfatase vacuolar de *A. thaliana* gerou plantas mais tolerantes a estresses abióticos em diversas espécies (GAXIOLA *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2005; PASAPULA *et al.*, 2011). O trabalho de Park *et al.* (2005) demonstrou que a expressão do gene *AVPID* resultou no aumento do crescimento radicular, absorção de água e no potencial hídrico da folha.

## 2.4 GALACTINOL SINTASE

Outra molécula que vem sendo estudada e relacionada com a tolerância a estresses é a galactinol sintase. Essa enzima catalisa a síntese de moléculas de galactinol e UDP a partir de UDP-gal e *mio*-inositol, e é considerada chave para a biossíntese de oligossacarídeos da família das rafinoses (RFO). A função na planta dos RFO ainda não é totalmente conhecida, porém, alguns autores já observaram uma relação destas moléculas com a tolerância a estresses salino e hídrico (SIQUEIRA *et al.*, 2008). Em alguns trabalhos, foi observado que os RFO podem servir como carboidratos de reserva e para transporte no floema (AYRE; KELLER, TURGEON, 2003), além de atuarem também como crioprotetores (PENNYCOOKE; JONES; STUSHNOFF, 2003).

Os açúcares, de uma maneira geral, possuem uma grande importância no metabolismo celular, uma vez que possuem a capacidade de controlar a expressão de diversos genes, além de atuar na regulação fonte-dreno, de uma maneira mais direta.

A biossíntese de RFO (Figura 1) inicia-se com a formação de uma molécula de galactinol através da transferência, pela enzima galactinol sintase, de uma galactosila para uma molécula de *mio*-inositol. Sequentemente, o galactinol doa a unidade de galactose para uma molécula de sacarose, formando a rafinose.



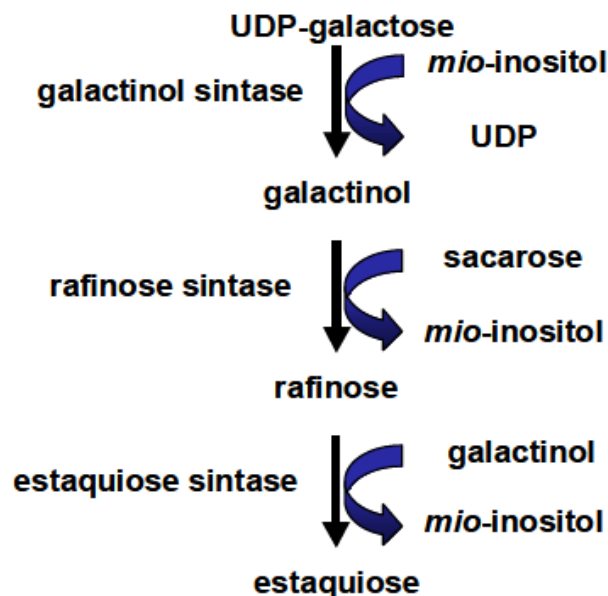


FIGURA 1: Biossíntese de galactinol, rafinose e estaquiose, em plantas (Fonte: SANTOS, 2008).

A partir dessas moléculas, outros compostos são formados na sequência desta via (estaquiose, verbascose e ajugose), onde atuam galactosiltransferases específicas, a partir da doação da unidade de galactose pelo galactinol (SANTOS, 2011) (Figura 2).

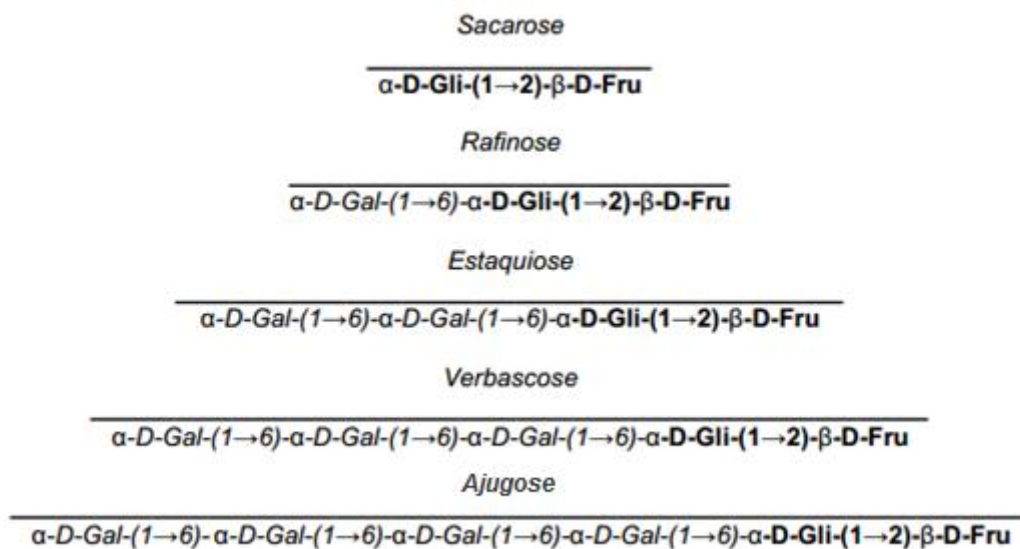


FIGURA 2: Relação estrutural dos oligossacarídeos da família das rafinose, formados a partir de sacarose e adições de galactose (Fonte: SOUZA; MORAES; RIBEIRO, 2005).

A enzima galactinol sintase é codificada pela família gênica *GolS*. Em *Arabidopsis thaliana* foram encontrados sete genes *GolS*, dos quais pelo menos três deles estão envolvidos nas respostas ao estresse. Duas isoformas do gene (*AtGolS1* e *AtGolS2*) foram induzidas sob condições de estresse hídrico e salino, e a isoforma *AtGolS3* foi expressa sob estresse térmico, segundo o trabalho de Taji *et al.* (2002).

Plantas de *A. thaliana* transformadas com *AtGolS* apresentaram maior tolerância à seca e ao frio e acumularam níveis mais altos de galactinol e rafinose do que as plantas não transformadas (TAJI *et al.*, 2002). Uma hipótese para explicar o papel desses açúcares na resposta aos estresses seria que estes atuam como osmoprotetores durante o período de déficit hídrico (SANTOS, 2008).

### 3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar aspectos moleculares relacionados à tolerância a estresses abióticos em cana baseados em estratégias de transgenia e busca de genes, envolvendo as enzimas pirofosfatase vacuolar e galactinol sintase.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Validar eventos transgênicos de cana-de-açúcar contendo o gene *AVP1*;

Buscar ortólogos do gene *GolS* em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em comparação com o genoma do sorgo (*Sorghum bicolor* L.).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1 VALIDAÇÃO DE EVENTOS TRANSGÊNICOS CONTENDO O GENE DA PIROFOSFATASE VACUOLAR EM CANA-DE-AÇÚCAR

#### 4.1.1 Obtenção de plantas transgênicas contendo o gene *AVPI*

Para a obtenção de plantas modificadas geneticamente que contenham o gene *AVPI*, proveniente de *A. thaliana*, utilizou-se a técnica de transformação por *Agrobacterium tumefaciens*. Foram utilizadas como fontes de explantes, plantas de cana-de-açúcar da variedade RB855156 cultivadas em campo no IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina), com aproximadamente sete meses. Os explantes foram cultivados em meio de indução suplementado, até a formação de calos embriogênicos.

A partir dos calos formados, o vetor pRG395 (CaMV35S::*AVP1D* – GAXIOLA *et al.*, 2001) foi utilizado para a transformação via *A. tumefaciens*, seguindo a metodologia descrita em Belintani *et al.* (2012). Após a transformação, as células que se apresentaram resistentes ao antibiótico foram cultivadas *in vitro* até atingirem tamanho adequado para serem transplantadas em vasos e mantidas em casa de vegetação.

#### 4.3.2 Extração de DNA e amplificação do gene *AVPI*

A extração de DNA das plantas transformadas foi realizada seguindo a metodologia de Doyle e Doyle (1987).

A partir das amostras de DNA extraído, realizou-se uma PCR (em inglês, *Polymerase Chain Reaction*), para a validação da inserção do gene de interesse.

Para a reação de PCR, utilizou-se 2 µL de Tampão PCR (10 X); 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM de dNTP, 0,5mM de cada *primer*, 7,5 U de *Taq* DNA polimerase, e 400 ng de DNA, obtendo-se um volume final de reação de 20 µL.

A reação ocorreu em um termociclador AB Applied Biosystems, modelo Veriti 96 Well Thermal Cycler, por 3 minutos a 94°C para a desnaturação, 40 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57 °C, 2:30 minutos a 72 °C, e 7 minutos a 72°C.

### 4.3.3 Eletroforese em gel de agarose

A partir dos produtos da PCR, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo. As bandas formadas foram observadas através da exposição do gel em luz ultra-violeta, e fotografado pela câmera *Kodak Digital Science* (KDS).

## 2.1 ESTUDO DO GENE DA GALACTINOL SINTASE

### 4.3.1 Busca por genes de galactinol sintase em Cana-de-açúcar

Inicialmente realizou-se uma busca do gene da galactinol sintase no genoma de *Arabidopsis thaliana*, no banco de dados “TAIR” (em inglês *The Arabidopsis Information Resource*) (<http://www.arabidopsis.org/>), pelo nome do gene, *AtGolS*, conforme descrito por Liu *et al.*, 1998. As sequências de aminoácidos obtidas foram salvas para posterior utilização.

A partir dos resultados encontrados no genoma de *A. thaliana*, buscou-se por ortólogos em cana-de-açúcar. Essa busca foi realizada no banco de dados de transcriptoma (<http://compbio.dfci.harvard.edu/>), uma vez que o genoma da cana ainda não foi caracterizado. Para a comparação das sequências de aminoácidos com o transcriptoma da cana, utilizou-se a ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), que compara sequências biológicas contra um banco de dados. Para essa comparação, utilizou-se o programa *tBlastn*, que compara as sequências de aminoácidos encontradas no genoma de *Arabidopsis* com o transcriptoma de cana, gerando como resultados sequências de nucleotídeos. Foram selecionadas as sequências com um valor de *e-value* menor que e-50.

### 4.3.2 Busca por genes de galactinol sintase no genoma de Sorgo

As sequências selecionadas anteriormente foram utilizadas em um busca no banco de dados *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/>), por ortólogos ao gene *GolS* no genoma de sorgo. Através da ferramenta BLAST, as sequências encontradas no transcriptoma de cana-de-açúcar foram comparadas com o genoma do sorgo. Os resultados com um valor de *e-value* inferior a e-50 foram selecionados, cujos domínios foram anotados para posterior utilização em outro banco de dados, o *GreenPhyl* (<http://www.greenphyl.org>). No *GreenPhyl*, sequências com o domínio IPR002495 também foram selecionadas, por conterem também o domínio *glycosyl transferase Family 8*, relacionado a síntese de galactinol.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 VALIDAÇÃO DE EVENTOS TRANSGÊNICOS CONTENDO O GENE DA PIROFOSFATASE VACUOLAR EM CANA-DE-AÇÚCAR

A partir de uma corrida eletroforética foi possível a visualização dos produtos gerados pela PCR com *primers* específicos para *AVPI* (Figura 3). Comparando as bandas obtidas no gel, nota-se que todos os eventos transgênicos (T4-1, T4-2, T4-3, T4-5, T7-1, T7-2 e T7-3) apresentaram o mesmo padrão de banda do controle positivo. Esse resultado indica que essas amostras apresentam um fragmento de DNA esperado para o gene de interesse.

Observa-se também que um dos controles (C5536) apresentou a banda correspondente ao gene de interesse, o que pode ser justificado pela contaminação do DNA estoque. Além disso, notam-se várias bandas inespecíficas, em todas as amostras. Estas bandas inespecíficas são produto de um uso excessivo de DNA genômico para reações de PCR (Figura 3). Futuras avaliações por PCR deverão utilizar uma concentração inferior de DNA genômico.

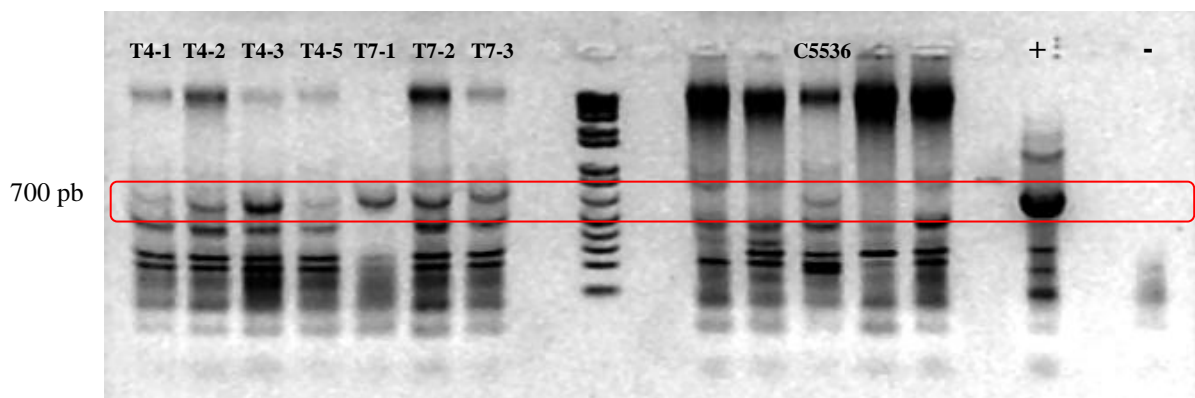


FIGURA 3: Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Destaque para a banda de interesse.

## 4.1 ESTUDO DO GENE DA GALACTINOL SINTASE

### 5.3.1 Busca por genes de galactinol sintase em Cana-de-açúcar

A busca por genes de galactinol sintase no genoma de *Arabidopsis thaliana* teve como resultados sete genes *AtGols*: *AtGols1*, *AtGols2*, *AtGols3*, *AtGols4*, *AtGols5*, *AtGols6* e *AtGols7* (Figura 4). Esses resultados concordam com os de Taji *et al.* (2002), que também identificou sete genes *AtGols* no genoma de *A. thaliana*. Estes autores verificaram ainda que três desses genes foram induzidos em situações de estresses, e que as plantas estressadas produziram uma quantidade maior de galactinol e rafinose.

Estudando três isoformas do gene da galactinol sintase em café, Santos *et al.* (2011) verificaram que, sob situações de estresses abióticos, as plantas aumentaram uma das isoformas desse gene, e que as isoformas respondiam diferentemente para cada estresse aplicado.

1	AT1G09350 Predicted to encode a galactinol synthase	AT1G09350.1	ATGOLS3 GALACTINOL SYNTHASE 3 GOLS3	carbohydrate biosynthetic process, inositol 3-alpha-galactosyltransferase activity, nucleus, response to cold, response to oxidative stress, transferase activity, transferase activity, transferring glycosyl groups, transferase activity, transferring hexosyl groups, transferring glycosyl groups, transferring hexosyl groups
2	AT1G56600 <i>Gols2</i> is a galactinol synthase that catalyzes the formation of galactinol from UDP-galactose and myo-inositol. <i>Gols2</i> transcri...	AT1G56600.1	ATGOLS2 GALACTINOL SYNTHASE 2 GOLS2	carbohydrate biosynthetic process, galactose metabolic process, inositol 3-alpha-galactosyltransferase activity, nucleus, response to abscisic acid stimulus, response to cold, response to oxidative stress, response to salt stress, response to water deprivation, transferase activity, transferase activity, transferring glycosyl groups, transferase activity, transferring hexosyl groups, transferring glycosyl groups, transferring hexosyl groups
3	AT1G60450 Predicted to encode a galactinol synthase.	AT1G60450.1	ATGOLS7 GALACTINOL SYNTHASE 7 GOLS7	carbohydrate biosynthetic process, nucleus, transferase activity, transferase activity, transferring glycosyl groups, transferase activity, transferring hexosyl groups, transferring glycosyl groups, transferring hexosyl groups
4	AT1G60470 Predicted to encode a galactinol synthase.	AT1G60470.1	ATGOLS4 GALACTINOL SYNTHASE 4 GOLS4	carbohydrate biosynthetic process, nucleus, response to oxidative stress, transferase activity, transferase activity, transferring glycosyl groups, transferase activity, transferring hexosyl groups, transferring glycosyl groups, transferring hexosyl groups
5	AT2G47180 <i>Gols1</i> is a galactinol synthase that catalyzes the formation of galactinol from UDP-galactose and myo-inositol. <i>Gols1</i> transcri...	AT2G47180.1	ATGOLS1 GALACTINOL SYNTHASE 1 GOLS1	carbohydrate biosynthetic process, cellular component unknown, galactose metabolic process, inositol 3-alpha-galactosyltransferase activity, response to abscisic acid stimulus, response to cold, response to heat, response to high light intensity, response to hydrogen peroxide, response to oxidative stress, response to salt stress, response to water deprivation, transferase activity, transferase activity, transferring hexosyl groups, transferring hexosyl groups
6	AT4G26250 Predicted to encode a galactinol synthase.	AT4G26250.1	ATGOLS6 GALACTINOL SYNTHASE 6 GOLS6	carbohydrate biosynthetic process, nucleus, transferase activity, transferase activity, transferring glycosyl groups, transferase activity, transferring hexosyl groups, transferring glycosyl groups, transferring hexosyl groups
7	AT5G23790 Predicted to encode a galactinol synthase.	AT5G23790.1	ATGOLS5 GALACTINOL SYNTHASE 5 GOLS5	carbohydrate biosynthetic process, cellular component unknown, transferase activity, transferase activity, transferring glycosyl groups, transferase activity, transferring hexosyl groups, transferring glycosyl groups, transferring hexosyl groups

FIGURA 4: Resultados da busca por *AtGols* no banco de dados TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>).

A partir das sequências encontradas no genoma de *A. thaliana*, foi possível, através da ferramenta BLAST, a identificação das sequências de nucleotídeos de genes da galactinol sintase em cana-de-açúcar. Apenas duas sequências foram selecionadas, com valores de *e-value* abaixo de  $e^{-50}$  (Figura 5).

```

Database: s_officinarum
121,342 sequences; 88,397,709 total letters.
Searching...10.....20....30....40....50....60....70....80....90....100% done

```

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Reading Frame	High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N	
s_officinarum TC114091	homologue to UniRef100_Q7XYY1 Clus...	+3	1379	5.5e-141	1
s_officinarum TC132202	homologue to UniRef100_QSDVS7 Clus...	+1	554	3.1e-77	2
s_officinarum CA280280	homologue to UniRef100_QSDVS7 Clus...	+2	459	3.4e-43	1
s_officinarum CA226330	similar to UniRef100_Q7XYY1 Cluste...	+3	200	4.2e-34	2
s_officinarum TC119463	homologue to UniRef100_QSNA53 Clus...	+3	190	1.4e-15	2
s_officinarum TC133946	homologue to UniRef100_QSNA53 Clus...	+3	193	4.6e-14	2
s_officinarum TC121414	similar to UniRef100_QSNA53 Cluste...	+1	193	6.5e-13	1
s_officinarum CA090732		+3	176	1.1e-12	1
s_officinarum TC153691	similar to UniRef100_Q0DUI6 Cluste...	+1	146	8.2e-12	2
s_officinarum TC143435	homologue to UniRef100_QSNA53 Clus...	+2	114	2.0e-10	3
s_officinarum TC114418	homologue to UniRef100_Q0DUI6 Clus...	+3	145	2.1e-09	2
s_officinarum CA177539	homologue to UniRef100_QSNA53 Clus...	+2	121	2.3e-07	3
s_officinarum CA226771	similar to UniRef100_QSDVS7 Cluste...	-2	130	4.7e-06	1
s_officinarum CA086214	homologue to UniRef100_QSNA53 Clus...	+1	63	0.43	2
s_officinarum CA222547	similar to UniRef100_Q0DUI6 Cluste...	+1	84	0.75	1

FIGURA 5: Resultados obtidos com a comparação de sequências correspondentes ao gene *AtGolS* em cana-de-açúcar.

Apesar de apenas duas sequências possuírem valor de *e-value* abaixo de  $e^{-50}$ , três sequências foram selecionadas e caracterizadas como galactinol sintase. Porém, a terceira sequência só foi obtida após a busca por sequências no genoma do sorgo (Item 5.2.2). Utilizando-se das sequências de galactinol sintases identificadas no genoma de sorgo (Item 5.2.2) foi possível identificar uma terceira sequência relacionada ao gene *GolS* em cana-de-açúcar (Figura 6).



```

Database: s_officinarum
121,342 sequences; 88,397,709 total letters.
Searching...10...20...30...40...50...60...70...80...90...100$ done

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:

Reading Frame    High Score    Smallest Sum    Probability P(N)    N
s_officinarum|TC114091  homologue to UniRef100_Q7XYY1 Clus... +3 1157 1.8e-117 1
s_officinarum|TC132202  homologue to UniRef100_Q5DVS7 Clus... +1 496 4.1e-63 2
s_officinarum|CA280280  homologue to UniRef100_Q5DVS7 Clus... +2 365 3.1e-33 1
s_officinarum|CA226330  similar to UniRef100_Q7XYY1 Cluste... +3 191 3.9e-27 2
s_officinarum|TC119463  homologue to UniRef100_Q5NA53 Clus... +3 192 6.1e-16 2
s_officinarum|TC133946  homologue to UniRef100_Q5NA53 Clus... +3 191 3.0e-15 2
s_officinarum|TC153691  similar to UniRef100_Q0DUI6 Cluste... +1 158 4.8e-14 2
s_officinarum|CA090732  similar to UniRef100_Q5NA53 Cluste... +3 186 5.8e-14 1
s_officinarum|TC121414  similar to UniRef100_Q5NA53 Cluste... +1 192 5.9e-13 1
s_officinarum|TC114418  homologue to UniRef100_Q0DUI6 Clus... +3 160 5.2e-12 2
s_officinarum|TC143435  homologue to UniRef100_Q5NA53 Clus... +2 108 6.5e-11 3
s_officinarum|CA177539  homologue to UniRef100_Q5NA53 Clus... +2 117 2.1e-06 2
s_officinarum|CA226771  similar to UniRef100_Q5DVS7 Cluste... -1 122 4.1e-05 1
s_officinarum|CA086214  homologue to UniRef100_Q5NA53 Clus... +1 63 0.69 2
s_officinarum|CA222547  similar to UniRef100_Q0DUI6 Cluste... +1 84 0.71 1

```

FIGURA 6: Resultados obtidos com a comparação de seqüências correspondentes ao gene *GolS* encontradas em Sorgo, com o transcriptoma de cana-de-açúcar.

### 5.3.2 Busca por genes de galactinol sintase no genoma de Sorgo

Após comparar as seqüências de nucleotídeos encontradas em cana-de-açúcar com o genoma do sorgo através das análises no banco de dados *Phytozome*, foram obtidos dois genes em sorgo como correspondentes ao gene *GolS*. Uma segunda procura no banco de dados *Greenphyl*, por seqüências contendo o domínio proteico IPR002495, identificaram mais quatro genes de sorgo correspondentes ao gene *GolS*. Com isso, foram obtidos um total de seis *loci* genômicos codificantes para enzimas com a propriedade galactinol sintase (Tabela 1).

TABELA 1: *Loci* genômicos correspondentes ao gene *GolS* em sorgo.

Nome do Loco
Sb01g037090
Sb02g043450
Sb04g022700
Sb06g024740
Sb07g005095
Sb09g020930

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através da PCR e do gel de agarose mostram que todas as plantas de cana-de-açúcar analisadas apresentaram o transgene *AVP1*.

Através da análise das sequências nucleotídicas e genômicas, foram identificados no transcriptoma de cana-de-açúcar três genes que codificam a enzima galactinol sintase, enquanto que no genoma completo de sorgo foram identificadas seis sequências para o gene em questão.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. C. V. de; LEITE, C. R. F.; SOUZA, J. R. P. de. Efeitos de maturadores nas características tecnológicas da cana-de-açúcar com e sem estresse hídrico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 441-448, 2005.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AYRE, B. G.; KELLER, F.; TURGEON, R. Symplastic continuity between companion cells and the translocation stream: longdistance transport is controlled by retention and retrieval mechanisms in the phloem. **Plant Physiology**, v. 131, p. 1518–1528, 2003.
- BELINTANI, N.G.; GUERZONI, J.T.S.; MOREIRA, R.M.P.; VIEIRA, L.G.E. Improving low-temperature tolerance in sugarcane by expressing the ipt gene under a cold inducible promoter. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 1, p. 71-77, 2012.
- BOHNERT, H.J.; GONG, Q.; LI, P., MA, S. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms – getting genomics going. **Current Opinion Plant Biology**, v. 9, p. 180-188, 2006.
- CARLIN, S. D.; RHEIN, A. F. de L.; SANTOS, D. M. M. dos. Efeito simultâneo da deficiência hídrica e do alumínio tóxico no solo na cultivar IAC91-5155 de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 553-564, 2012.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA, A, V, O.; FILGUEIRAS, T. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANNH. P.; LANDELL, M. G. A.; MACEDON.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. C.; ROMANO, E.; DA SILVA, W. J.; SILVA FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, n.4, p. 62–89, 2011.
- CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira – Cana-de-açúcar. Safra 2012/2013, 4º levantamento, abril de 2013. 18 f. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_04\\_09\\_10\\_30\\_34\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_s\\_abril\\_2013\\_4o\\_lev.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_30_34_boletim_cana_portugues_s_abril_2013_4o_lev.pdf)>. Acesso em 13/06/2013.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.
- GAXIOLA, R. A.; LI, J.; UNDURRAGA, S.; DANG, L. M.; ALLEN, G. J.; ALPER, S. L.; FINK, G. R. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n.20, p. 11.444-11.449, 2001.
- GAXIOLA, R. A.; RAO, R.; SHERMAN, A.; GRISAFI, P.; ALPER, S. L.; FINK, G. R. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p.1480-1485, 1999.

GONÇALVES, E. R.; FERREIRA, V. M.; SILVA, J. V.; ENDRES, L.; BARBOSA, T. P.; DUARTE, W. de G. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v.14, n.4, p.378–386, 2010.

LIU, J. J.; KRENZ, D. C.; GALVEZ, A. F.; DE LUMEN, B. O. Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. **Plant Science**, v. 134, p. 11–20, 1998.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; CAMPOS, M. K. F. de; CARVALHO, J. F. R. P. de; BESPALHOK FILHO, J. C.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, p. 218–229, 2007.

MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and Regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p. 1-16, 2000.

PARK, S.; LI, J.; PITTMAN, J. K.; BERKOWITZ, G. A.; YANG, H.; UNDURRAGA, S.; MORRIS, J.; HIRSCHI, K. D.; GAXIOLA, R. A. Up-regulation of H<sup>+</sup>-pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-Ppase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 52, p. 18830-18835, 2005.

PASAPULA, V.; SHEN G.; KUPPU, S.; PAEZ-VALENCIA, J.; MENDOZA, M.; HOU, P.; CHEN, J.; QIU, X.; ZHU, L.; ZHANG, X.; AULD, D.; BLUMWALD, E.; ZHANG, H.; GAXIOLA, R.; PAYTON, P. Expression of an Arabidopsis vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase gene (*AVPI*) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, p. 88–99, 2011.

PETERS, S., MUNDREE, S. G., THOMSON, J. A., FARRANT, J. M., KELLER, F. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 8, p. 1947–1956, 2007.

PENNYCOOKE, J. C., JONES, M. L., STUSHNOFF, C. Down-regulating  $\alpha$ -galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia. **Plant Physiology**, 133, 901–909, 2003.

SANTOS, T. B. dos. **Expressão de três isoformas de galactinol sintase em plantas de *Coffea arabica* L. submetidas a estresses abióticos**. Tese. (Doutorado). Universidade Estadual de Londrina – UEL, 2008.

SANTOS, T. B. dos; BUDZINSKI, I. G. F.; MARUR, C. J.; PETKOWICZ, C. L. O.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 441-448, 2011.

- SARAFIAN, V.; KIM, Y.; POOLE R. J.; REA, P. A. Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 1775-1779, 1992.
- SILVA, H. A. P. da; GALISA, P. de S.; OLIVEIRA, R. S. da S.; VIDAL, M. S.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L. Expressão gênica induzida por estresses abióticos em nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.6, p.797-807, 2012.
- SIQUEIRA, A. F.; CRUZ, Z. M. A.; QUEIROZ, S.; ROCHA, O. J. A. M.; SOARES, D. N. E. S.; RAMOS, A. C. Desvendando a H<sup>+</sup>-Pirofosfatase vacuolar e o seu papel na biotecnologia vegetal. **Natureza on line**, v. 6, n. 1, p. 9-15, 2008.
- SOUZA, A. de; MORAES, M. G. de; RIBEIRA, R. de C. L. F. Gramíneas do cerrado: carboidratos não-estruturais e aspectos ecofisiológicos. **Acta Botânica Brasileira**, v.19, n.1, p.81-90, 2005.
- SUN, F.; HOU, X.; LI, Y.; YANG, X. Molecular cloning and characterization of nitrate reductase gene from non-heading Chinese cabbage. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 1-10, 2008.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3<sup>a</sup> ed, p. 116-122, 613. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 29, p. 417-426, 2002.
- TAVORA, F. J. A. F.; FERREIRA, R. G.; HERNANDEZ, F. F. F. Crescimento e relações hídricas em plantas de goiabeira submetidas a estresse salino com NaCl. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 441-446, 2001.
- TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J.; JULIANETTI, A.; HULSHOF, T.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Aspectos da fisiologia de produção da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.3, n.3, p. 215-221, 2010. Disponível em: < <http://revistas.unicentro.br/index.php/repaa/article/view/1065/1256>>. Acesso em: 15/06/2013.
- ÚNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br>>. Acesso em: 03/06/2013.
- VICENTINI, R.; DEL BEM, L. E. V.; VAN SLUYS, M. A.; NOGUEIRA, F. T. S.; VINCENTZ, M. Gene Content Analysis of Sugarcane Public ESTs Reveals Thousands of Missing Coding-Genes and an Unexpected Pool of Grasses Conserved ncRNAs. **Tropical Plant Biology**, v.5, p.199–205, 2012.