

JULIA TUFINO SILVA GUERZONI

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QUINASE DE *Nicotiana* (NPK1) AUMENTA A
TOLERÂNCIA À SECA EM CANA-DE-AÇÚCAR TRANSGÊNICA**

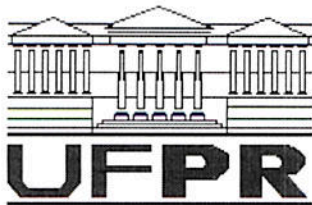
Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof^o. Dr^o. João Carlos Bernaldo Filho

Co-orientador: Dr^o. Douglas Silva Domingues

CURITIBA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL




PARECER


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a argüição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata **JULIA TUFINO SILVA GUERZONI**, sob o título "EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QUINASE DE *Nicotiana* (NPK1) AUMENTA A TOLERÂNCIA À SECA EM CANA-DE-AÇÚCAR TRANSGÊNICA", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.


Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese.


Curitiba, 27 de Novembro de 2015.


Professor Dr. Cícero Deschamps
Coordenador do Programa


Professor Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira
Primeiro Examinador


Professor Dr. Douglas Silva Domingues
Segundo Examinador


Professora Dra. Andrea Akemi Hoshino
Terceira Examinadora


Dr. Eduardo Fermino Carlos
Quarto Examinador


Professor Dr. João Carlos Bernalhok Filho
Presidente da Banca e Orientador

*Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e
conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; se
não tiver caridade, não sou nada.*

(I Coríntios, 13-2)

DEDICO

Aos meus filhos

Laura e Pedro

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, em especial ao Programa de Pós-graduação em Agronomia - Produção Vegetal, pela oportunidade concedida para a realização do curso.

A Lucimara pela disposição em esclarecer todas as dúvidas em relação ao curso de doutorado no decorrer destes quatro anos.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), pela oportunidade concedida para a realização da minha tese de doutorado.

A CAPES pela concessão da Bolsa, em especial ao Dr^o Hugo Bruno Correa Molinari pela indicação da bolsa dentro do projeto.

Ao orientador Dr^o. João Carlos Bessalho Filho pela orientação, paciência e amizade durante toda a realização do curso.

Ao co-orientador Dr^o. Douglas Silva Domingues, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR, por ter me apoiado na continuação da minha formação acadêmica, e acompanhado diretamente o meu trabalho.

Ao Prof^o. Dr^o. Luiz Filipe Protásio Pereira que sempre esteve disposto a me ajudar e a esclarecer as dúvidas, dar sugestões e apoiar o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Dr^o Fábio S. de Souza pelas contribuições e disposição para fazer as coletas das análises fisiológicas durante o período do experimento.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e LBI, que em todos os momentos me ajudaram de uma forma direta ou indireta no desenvolvimento do meu trabalho, seja com a concessão de materiais, uma mãozinha na realização dos trabalhos ou através de muitas risadas e amizade. Em especial a Andrea, Rafael que colaboram diretamente para minhas análises.

À professora e amiga Dr^a Rosangela Moreira que me ajudou na coleta de dados e nas minhas análises estatísticas, sempre me apoiando e torcendo por todo o meu trabalho e sucesso profissional.

Á minha família que sempre acreditou em mim, me apoiou em todas as minhas decisões e me incentivou a fazer este curso.

A todos que deram sua parcela de contribuição para que este trabalho se realizasse.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cana-de-açúcar.....	3
2.1.1 Necessidades do setor sucroalcooleiro.....	3
2.1.2 A cultura da cana-de-açúcar e o bioetanol.....	4
2.1.3 O melhoramento da cana-de-açúcar e a biotecnologia.....	6
2.2 Estresses abióticos	8
2.2.1 Estresse hídrico em cana-de-açúcar.....	8
2.2.2 Alterações fisiológicas sob condição de seca.....	9
2.2.3 Mecanismos moleculares e bioquímicos de tolerância ao estresse hídrico.....	12
2.3 Gene <i>NPK1</i> (MAPKKK) de <i>Nicotiana</i>	16
2.4 Promotor constitutivo <i>35SCAPPDK</i>	20
3. REFERÊNCIAS	22
4. CAPÍTULO I	
DESEMPENHO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE CANA-DE AÇÚCAR COM O GENE NPK1 DE TABACO SOB PRIVAÇÃO DE ÁGUA	45
RESUMO	46
ABSTRACT	47
5.1 INTRODUÇÃO	48
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	52
5.2.1 Vetor	52
5.2.2 Transformação genética – Biobalística	52
5.2.3 Transformação genética – <i>Agrobacterium</i>	54
5.2.4 Reação em cadeia da polimerase - PCR	57
5.2.5 Experimento de deficit hídrico	57

5.2.6	Análise transcricional do transgene	58
5.2.7	Fotossíntese, transpiração e condutância estomática	59
5.2.8	Conteúdo relativo de água, potencial total da água e osmótico	59
5.2.9	Prolina e conteúdo de MDA	60
5.2.10	Conteúdo de clorofila total	61
5.2.11	Determinação da biomassa.....	61
5.2.12	Análise estatística	61
5.3	RESULTADO E DISCUSSÃO	62
5.3.1	Transformação genética e seleção dos eventos	62
5.3.2	Análise da inserção do transgene.....	62
5.3.3	Experimento de estresse hídrico.....	63
5.3.3.1	Análises fisiológicas.....	63
5.3.3.2	Relações hídricas nas folhas	67
5.3.3.3	Prolina, MDA e conteúdo de clorofila	71
5.3.3.4	Avaliações de biomassa	76
5.3.3.5	Análise da expressão do transgene.....	77
5.4	CONCLUSÕES GERAIS	79
5.5	REFERÊNCIAS	80

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01 - Convergência de respostas a estresses abióticos e bióticos nas proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) via espécies reativas de oxigênio (ROS) como fator comum para a ativação de genes de defesa antioxidativa (Scandalios, 2005)..... 19
- FIGURA 02 - Representação do T-DNA do vetor pSHX004 utilizado na transformação de cana. RB, borda direita; P35S**, promotor CaMV35S modificado (35SC4PPDK); fragmento do gene NPK1; Tnos, terminador nopalina sintase; P35S*, promotor 2X CaMV35S; TEV, região 5'UTR do tobacco etch virus; bar, fofinotricina acetiltransferase; Tvsp, terminador de proteína de armazenamento de soja; LB, Borda esquerda..... 52
- FIGURA 03 - Transformação genética de cana-de-açúcar por biobalística. **A** - Meristema apical de cana-de-açúcar com 2-3 mm em meio MSC3. **B** - Calos embriogênicos obtidos após 4 semanas de cultivo, multiplicados em meio MSC1. **C** - Calos embriogênicos em meio osmótico. **D** - Aparelho de bombardeamento. **E** - Regeneração dos calos embriogênicos em meio seletivo contendo glufosinato de amônio. **F** - Calo tolerante regenerando em meio seletivo. **G** - Regeneração de plantas transgênicas putativas. **H** - Aclimação das plantas em casa-de-vegetação..... 54
- FIGURA 04 - Transformação genética de cana-de-açúcar por *Agrobacterium tumefaciens*. **A** - Plântulas de cana-de-açúcar regenerada *in vitro*. **B**, **C** e **D** - Plântulas de cana-de-açúcar individualizadas e preparadas para o corte do explante. **E** - Separação do explante para inoculação com a *Agrobacterium*. **F** - Explantes em meio seletivo contendo glufosinato de amônio. **G** e **H** - Calos embriogênicos regenerando em meio seletivo. **I** - Regeneração de plantas transgênicas putativas. **J** - Cultivo das plantas em casa-de-vegetação..... 56
- FIGURA 05 - Análise da presença do transgene *NPK1* em eventos transgênicos putativos de cana-de-açúcar. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados a partir do DNA de folhas de cana-de-açúcar. **M**: marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen); **Agro1**, **Agro2**, **CV7**, **CV9**: diferentes eventos de transformação; **C-**: planta controle não transformada; **B**: branco (água); **C+**: plasmídeo pSHX004..... 63
- FIGURA 06 - Fotossíntese, condutância estomática e transpiração em plantas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPK1* e planta controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE (n=3). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%)..... 66

- FIGURA 07 - Conteúdo relativo de água em plantas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPKI* e planta controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE (n=3). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%)..... 68
- FIGURA 08 - Potencial total de água e potencial osmótico em plantas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPKI* e planta controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE (n=3). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%)..... 70
- FIGURA 09 - Conteúdo de prolina livre em folhas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPKI* e planta controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE (n=3). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%)..... 73
- FIGURA 10 - Conteúdo de malondialdeído (MDA) em plantas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPKI* e planta controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE (n=3). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%)..... 74
- FIGURA 11 - Clorofila total, em plantas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPKI* e planta controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE (n=3). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%)..... 75
- FIGURA 12 - Massa seca de raiz e parte aérea em plantas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPKI* e planta controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE (n=3). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%)..... 76

FIGURA 13 - Análise transcricional do transgene *NPKI* em folhas de plantas de cana-de-açúcar transgênicas, obtidas por agroinfecção T(A) e biobalística T(B), durante o estresse hídrico e após reidratação (REC). A condição normal de cultivo (Dia 0) foi definido como 1 para as análises relativas de expressão. Valores são apresentados pela média \pm SE (n=3). Letras comparam o mesmo evento transgênico entre os dias de estresse. Letras iguais representa não haver diferença significativa entre as médias $P < 0,05$ pelo método dos contrastes ortogonais.....

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), seguido pela Índia e China. A cana é produzida em quase todas as regiões do Brasil e, devido às diferentes condições edafo-climáticas encontradas no país, a cultura está sujeita a estresses ambientais, como o déficit hídrico. Até o momento, o desenvolvimento de variedades melhoradas tem sido a principal estratégia para a produção de materiais tolerantes a ambientes com condições de crescimento sub-ótimas. No entanto, novas ferramentas permitem o estudo e a manipulação da expressão dos genes, possibilitando um melhor entendimento dos mecanismos biológicos, e o consequente uso de plantas geneticamente modificadas com a introdução de genes que confirmam tolerância a estresses. Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar transgênicas mais tolerantes ao déficit hídrico superexpressando o gene NPK1. Este gene foi isolado de plantas de tabaco, sendo ativado na presença dos H₂O₂ e inicia uma cascata metabólica de proteínas-quinases ativadas por MAPKs. A cascata MAPK funciona em resposta a estresses osmóticos que ocorrem nas plantas em condições extremas de seca. Para tanto, foi utilizado o vetor pSHX004, que é composto pelo domínio catalítico do gene NPK1, sob controle de promotor constitutivo CaMV35S modificado. Foram utilizados os métodos de transformação por bombardeamento de partículas e infecção por *Agrobacterium tumefaciens* e, para ambos, calos embriogênicos da variedade RB855536 foram selecionados com 5 mg/L de glufosinato de amônio. Plantas de cana-de-açúcar transgênicas potencialmente transformadas geneticamente foram obtidas pelos dois métodos apresentando o fragmento do transgene confirmado por PCR. Foram então selecionados dois eventos transgênicos - um de cada método de transformação - para as análises de tolerância ao estresse hídrico em casa de vegetação. Estes eventos foram submetidos à restrição hídrica por 12 dias e em seguida foram reidratados. As plantas transgênicas apresentaram melhor desempenho, em relação à plantas-testemunha (não transformadas geneticamente) nas análises de relação hídrica nas folhas, a partir do sexto dia de estresse hídrico. Nas análises de assimilação de gás carbônico, condutância estomática e transpiração, as plantas com NPK1 apresentaram melhor desempenho a partir do nono dia, e também apresentaram menor conteúdo de prolina livre no 6^o, 9^o e 12^o dias após a suspensão da irrigação e menor dano celular, medido pelo conteúdo de malondialdeído, após 12^o dia de restrição hídrica e na reidratação. Dessa forma, espera-se que essas plantas tenham maior potencial de produtividade em situações comumente observadas em períodos sazonais de seca verificados nas principais regiões produtoras do país.

Palavra-chave: *Saccharum* spp.; estresse abiótico; proteína quinase; MAPK

ABSTRACT

EXPRESSION OF A PROTEIN KINASE (NPK1) from *Nicotiana* ENHANCE DROUGHT TOLERANCE IN TRANSGENIC SUGARCANE

Brazil is the largest producer of sugarcane (*Saccharum* spp.), followed by India and China. Sugarcane is produced in almost all regions of Brazil and, due to different soil and climatic conditions of the country, the culture is subjected to environmental stresses such as drought. Until now, the development of improved varieties has been the main strategy for the production of materials tolerant to environments with sub-optimal growth conditions. However, new tools enable the study and manipulation of gene expression, providing a better understanding of the biological mechanisms and the use of genetically modified plants by introducing genes that confer stress tolerance. This study aimed to develop transgenic sugarcane plants more tolerant to drought by overexpressing the gene NPK1 of tobacco plants, which is activated in the presence of H₂O₂ and initiates a metabolic cascade of protein kinases activated by MAPKs. The MAPK cascade operates in response to osmotic stress that occurs in plants under extreme conditions of drought. For this, we used the pSHX004 vector, which contains the catalytic domain of NPK1 gene under control of a modified CaMV35S constitutive promoter. Embryogenic calli of variety RB855536 were transformed with particle bombardment and *Agrobacterium tumefaciens* and selection was done using 5 mg/L ammonium glufosinate. Putative transgenic sugarcane plants were obtained by the two methods and confirmation of the insertion of the transgene was done by PCR. Two transgenic events obtained by each transformation method were selected for the analysis of tolerance to water deficit under greenhouse conditions. These events were submitted to water restriction for 12 days and then were rehydrated. Transgenic plants performed better compared to non transgenic plants in the analysis of water potential and relative water content (RWC) in the leaves, from the sixth day of water stress. Regarding carbon dioxide assimilation, stomatal conductance and transpiration, plants with NPK1 performed better from the ninth day, and had lower free proline content in the 6th, 9th and 12th days after stopping irrigation and less cell damage, measured by malondialdehyde content, at the end of the experiment. Thus, our data showed that these plants have great potential in situations commonly found in seasonal drought periods observed in the main producing regions.

Key words: *Saccharum* spp., abiotic stress, protein kinase, MAPK

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) se destaca atualmente como cultura de grande importância no mercado internacional principalmente pela atenção dada a um de seus produtos, o etanol, visto como uma alternativa viável à substituição dos combustíveis fósseis. Na safra 2013/2014 a cadeia sucroenergética nacional movimentou US\$ 43 bilhões, o que representou cerca de 2% do PIB nacional (UNICA, 2014). O setor sucroenergético emprega diretamente 1 milhão de trabalhadores e, no que diz respeito a empregos indiretos, existem mais de 16 mil estabelecimentos vinculados à produção de cana, açúcar e etanol (UNICA, 2014). A produção total de cana-de-açúcar moída na safra 2014/15, foi de 653 milhões de toneladas. A área nacional cultivada foi de 8,8 milhões de hectares, sendo o estado de São Paulo o maior produtor e o Paraná o quinto no ranking dos estados produtores. Na safra 2014/2015, a produção de açúcar chegou a 37 milhões de toneladas e a produção de etanol total a 27 bilhões de litros (CONAB, 2015).

O melhoramento genético da cana encontra maiores desafios em relação a outras culturas economicamente importantes devido ao seu alto nível de poliploidia, heterose, aneuploidia, genoma complexo, e longos ciclos de propagação e seleção (GUPTA *et al.*, 2010). Devido a esta complexidade genética o uso de técnicas de engenharia genética é uma alternativa para o melhoramento, que busca o aumento da produtividade e sustentabilidade ambiental às futuras variedades (SEGATO *et al.*, 2006).

Os fatores abióticos, como seca, calor e salinidade, são os principais responsáveis pela distribuição geográfica e pela produtividade das culturas agrônômicas. Eles constituem a principal causa de prejuízos econômicos na produção, sendo responsáveis por até 50% de perda em alguns casos (BRAY *et al.*, 2000). A falta de água é uma das mais importantes limitações para o crescimento de plantas e, conseqüentemente, para a produtividade das culturas (JANGPROMMA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014). Seus efeitos nas plantas incluem redução nas taxas de assimilação de CO₂, tamanho das células foliares, taxa de transpiração, potencial de água na planta, taxa de crescimento e abertura estomática (TAIZ & ZEIGER, 2004). Sendo assim, o déficit hídrico influencia de maneira direta o crescimento dos perfilhos e a altura final dos colmos e, conseqüentemente, a produção de açúcar (GASCHO & SHIH, 1983).

Uma resposta típica das plantas aos estresses ambientais é a acumulação de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) (HARE *et al.*, 1998), que pode ativar genes protetores que

codificam proteínas que conferem tolerância aos estresses (KOVTON *et al.*, 2000), ou genes que ativam diferentes módulos de percepção e transdução dos sinais de estresse tais como os reguladores de transcrição. O gene *NPK1* isolado de tabaco, é ativado na presença dos H_2O_2 e inicia uma cascata metabólica de proteínas-quinases ativadas por MAPKs. A cascata MAPK funciona em resposta a estresses osmóticos que ocorrem nas plantas em condições extremas de seca.

Os genes envolvidos na percepção e transdução de sinais de respostas ao estresse hídrico estão diretamente ligadas ao crescimento das plantas (ZHU, 2002). Assim, no estresse osmótico, a percepção da sinalização ocorre pela mudança na turgescência. Várias proteínas quinases ativadas pelo estresse osmótico provavelmente mediam essa sinalização. Como consequência, ocorrem alterações na expressão gênica e ativação de várias classes de proteínas e osmólitos (ZHU, 2002). O estresse hídrico também é sinalizado por mudanças na concentração do cálcio celular, as quais seriam percebidas tipicamente por proteínas de ligação ao cálcio. Um exemplo dessas proteínas, que ocorre como uma família gênica é a caucineurina B (CBL). Um membro da família, CBL1, é altamente induzido por múltiplos sinais de estresse (CHEONG *et al.*, 2003).

A obtenção de variedades com a inserção de genes induzidos pelo estresse possibilitará contar com valioso material tanto para estudos sobre os mecanismos de estresse em plantas perenes como para utilização direta em sistemas produtivos. Dessa forma, espera-se proporcionar maior produtividade e longevidade às plantas, evitando-se perdas comumente observadas em períodos sazonais de seca, verificados nas principais regiões produtoras do país.

Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar transgênicas superexpressando o gene *NPK1*, que codifica um fragmento de MAPKKK de tabaco, sob controle do promotor constitutivo 35S modificado e avaliar a tolerância ao déficit hídrico dessas plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cana-de-açúcar

2.1.1 Necessidades do setor sucroalcooleiro

A perspectiva do Brasil se consolidar como o principal produtor e exportador mundial de combustível renovável de elevado conteúdo energético é viável graças à sua grande dimensão numa região tropical, além de imensas áreas com potencial de ocupação. Neste novo cenário, a cultura da cana-de-açúcar tem um papel fundamental para atender as demandas dos mercados doméstico e internacional (CHEAVEGATTI -GIANOTTO *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, a cadeia de produção da cana-de-açúcar tornou-se complexa. Além de agricultores e usinas/destilarias, passaram a fazer parte da cadeia empresas distribuidoras de combustíveis, empresas concessionárias de energia, rede de exportação (empresas, portos e países importadores), postos de combustíveis, indústrias farmacêutica e química e os consumidores finais. Tudo isso porque, no setor de biocombustíveis, o etanol de cana é um produto no qual o Brasil possui grande competitividade no mercado internacional, atraindo investimentos e parcerias de grandes *players* do setor de química, biotecnologia e energia, que veem na produção brasileira de cana-de-açúcar uma alternativa importante de produção energética para o futuro (WALTZ, 2010; ARRUDA, 2011; GRUSHKIN, 2011). Apesar dos excelentes resultados alcançados no incremento de produção nos últimos 40 anos, devido ao pioneirismo brasileiro em pesquisas na área, o setor ainda tem grandes possibilidades de incremento de produção. Para isso, áreas como a química de álcoois, biologia de sistemas, genômica e biotecnologia terão papel preponderante (ARRUDA, 2011).

O setor sucroenergético é um dos principais setores do agronegócio brasileiro. Os seus dois principais produtos, o açúcar e o etanol, movimentam a economia brasileira na ordem de US\$ 12 bilhões (UNICA, 2014). Sendo assim, o Brasil é o maior produtor mundial de açúcar e o segundo produtor de etanol, com destaque também no uso de biocombustível como alternativa energética. Na safra 2014/2015 foram colhidas cerca de 653 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (UNICA, 2014).

No setor de biocombustíveis, o etanol é o produto que o Brasil possui a maior competitividade no mercado internacional e potencial para atrair parcerias de outros países

para a expansão da cultura. O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produção de etanol, perdendo apenas para os Estados Unidos que produziu em 2014, 49 bilhões de litros (RFA, 2014). No entanto, a plataforma de obtenção de etanol a partir de cana-de-açúcar desenvolvida no Brasil é considerada a mais eficiente por suas vantagens ambientais e socioeconômicas. Além disso, é o único país a utilizar o etanol em larga escala como combustível renovável e alternativo ao petróleo (UNICA, 2014). Para atender a demanda crescente do consumo interno de álcool, o Brasil precisará produzir cerca de 50 bilhões de litros até 2019 (UNICA, 2014). Com o aumento da produção mundial, o etanol pode vir a se consolidar como *commodity*.

O melhoramento genético convencional da cana-de-açúcar, realizado através dos métodos tradicionais de cruzamentos e seleção de plantas, obteve até o momento relativo sucesso no atendimento do setor produtivo. Graças ao melhoramento convencional, a cultura da cana-de-açúcar duplicou o rendimento de açúcar por tonelada de cana moída (UNICA, 2010). Um exemplo de sucesso do melhoramento genético tradicional é a RIDESA, que desenvolveu diversas variedades que figuram entre as mais cultivadas e são produzidas em todas as regiões canavieiras do Brasil. Apesar deste sucesso e incremento produtivo, ainda persistem fortes perdas devido a influências bióticas e abióticas (SEGATO *et al.*, 2006; CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011).

A biotecnologia surge como um importante fator que permite ganhos de produtividade e aumento de oferta de produtos agrícolas, ao mesmo tempo em que pode reduzir o ritmo de exploração de novas áreas agricultáveis, gerando com isto dividendos positivos para o meio ambiente e para a sociedade. A biotecnologia pode oferecer alternativas para a redução do tempo de obtenção de novos genótipos, como a produção de plantas transgênicas (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011).

2.1.2 A cultura da cana-de-açúcar e o bioetanol

A cana de açúcar é uma cultura de grande importância econômica por causa de seu uso mundial na indústria de alimentos bem como uma fonte valiosa para a produção de biocombustíveis renovável. É cultivada em regiões tropicais e subtropicais em mais de 90 países, e o Brasil é líder mundial na produção de cana (WACLAWOVSKY *et al.*, 2010). O Brasil está na vanguarda da produção de cana-de-açúcar. A cultura foi introduzida no início do período colonial e no século XVII ganhou destaque na produção de açúcar. A partir da

década de 1930, deu-se início às pesquisas brasileiras que visavam a viabilidade da produção de etanol de cana-de-açúcar, com a criação do Instituto do Açúcar e do Alcool, intensificadas com a criação do programa Proálcool em 1975 (MACCHERONI *et al.*, 2009). O interesse do governo brasileiro pela cultura focava a produção do etanol para ser adicionado à gasolina, já que nesse período o preço do barril de petróleo atingia marcas recordes.

As heranças do programa Proálcool foram de grande valia ao setor sucroalcooleiro principalmente pelo rompimento de barreiras tecnológicas que poderiam vir a ameaçar a competitividade da agroindústria do açúcar e do álcool. O investimento em pesquisas voltadas ao melhoramento das cultivares e a introdução de técnicas biotecnológicas nos processos fermentativos e de destilação e o progresso para expansão da cultura no campo colocou o Brasil em posição privilegiada no cenário internacional, produzindo etanol de cana-de-açúcar em preço e escala competitivo (GOLDEMBERG *et al.*, 2004).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (WACLAWOVSKY *et al.*, 2010). O país deve alcançar taxa média de aumento da produção de açúcar de 3,25% até 2018/19 e 47,34 milhões de toneladas do produto. Já para o etanol, a produção projetada para 2019 é de 58,8 bilhões de litros, sendo que o consumo interno está projetado em 50 bilhões de litros (MAPA, 2014). O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produção de etanol, perdendo apenas para os Estados Unidos (RFA, 2010).

Os benefícios ambientais pelo uso do etanol como biocombustível estão principalmente relacionados ao balanço energético e a redução da emissão de gases do efeito estufa, dentre eles o gás carbônico (CO₂). O CO₂ quando liberado pela queima do etanol e do bagaço da cana, um co-produto gerado pela indústria sucroalcooleira, é reabsorvido durante o crescimento da cultura através da fotossíntese. Há ainda diminuição da liberação de monóxido de carbono e redução da liberação de gases nocivos pela simples adição de etanol à gasolina (GOLDEMBERG *et al.*, 2008). O etanol de cana-de-açúcar apresenta um balanço energético extremamente favorável, com mais de nove unidades de energia renovável geradas para cada unidade de energia fóssil consumida no processo. O Programa de Combustíveis Renováveis da Agência de Proteção Ambiental Americana classificou ainda o etanol de cana-de-açúcar como um combustível avançado, capaz de reduzir as emissões de gases de efeito estufa de 61% a 91% em relação à gasolina (UNICA, 2014). E ainda, a cana tem sido considerada como a principal matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração a partir da sua biomassa (BOARETTO & MAZZAFERA, 2013).

O cultivo de cana-de-açúcar concentra-se na região Centro-Sul do Brasil e o estado de São Paulo é o maior responsável pela produção e exportações brasileiras (UNICA, 2014). A maior concentração e produtividade do Centro-Sul devem-se dentre outros fatores às condições de produção, tipo de solo, topografia e tecnologia aplicada. Já nas regiões Nordeste e Centro-Oeste, onde a cultura vem ganhando espaço, a irregularidade e a escassez de chuvas e a falta de variedades adaptadas a essas condições são as causas principais para a baixa expressividade na produção. Dados do INPE mostram ainda que mais de 60% da expansão recente de cana-de-açúcar na região Centro-Sul ocorreu em áreas de pastagens, em sua maior parte degradadas. A expansão da cana no Brasil é guiada pelo Zoneamento Agroecológico da Cana-de-Açúcar, lançado em 2009 pelo Governo Federal, que define uma área equivalente a 7,5% do território brasileiro como apta para o cultivo da cana-de-açúcar (UNICA, 2014)

Para atender as expectativas de produção de açúcar e álcool lançados para os próximos anos, bem como consolidar a liderança brasileira no setor, será necessário um aumento da produtividade, pois o aumento das áreas produtivas não deverá ser suficiente para atender a demanda de produção, até porque as regiões de expansão apresentam características diferentes daquelas já ocupadas pela cultura. Dessa forma, os investimentos em ações que integram programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar, somados a pesquisas em biologia molecular e biotecnologia, são de grande valia para a expansão e sustentabilidade da cultura no país (SEGATO *et al.*, 2006; CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011).

2.1.3 O melhoramento da cana-de-açúcar e a biotecnologia

Atualmente, no Brasil, destacam-se três programas de melhoramento de cana-de-açúcar: RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro), CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) e IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011).

As variedades de cana cultivadas atualmente são híbridos resultados de cruzamentos interespecíficos entre as espécies *Saccharum officinarum* ($2n = 80$ cromossomos), espécie que contribuiu para o incremento no teor de açúcar do colmo, e *S. spontaneum* ($2n = 40-128$ cromossomos), espécie selvagem responsável pelo vigor vegetativo e resistência a doenças (MING *et al.*, 2001), que foram seguidos por várias gerações de retrocruzamentos. Uma característica importante da cana-de-açúcar é o seu alto grau de aneuploidia e poliploidia, o que faz da cana uma das espécies com genoma mais complexo dentre as monocotiledôneas,

com tamanho total que pode chegar a 10 Gbp (HOTTA *et al.*, 2010). Este choque interespecífico de genomas, ao mesmo tempo em que cria uma enorme variabilidade genética, impõe dificuldades ao melhoramento, com obstáculos para abordagens genéticas, fisiológicas e bioquímicas para a sua melhoria, pois torna a obtenção de clones elites – indivíduos portadores de características agronômicas desejáveis – um processo oneroso (D’HONT *et al.*, 2008). Porém, o enorme impacto dos biocombustíveis sobre a economia, a exploração bem-sucedida de cana como bio-fábrica, e as mudanças climáticas mudaram o foco global e identificou a necessidade de intensificar as pesquisas em cana-de-açúcar (AZEVEDO *et al.*, 2011).

Um programa de melhoramento clássico de cana-de-açúcar, desde a realização de cruzamentos até a liberação do cultivar, pode levar aproximadamente 13 anos. No caso de características que são controladas por múltiplos genes e que sofrem influência do ambiente, como a seca e salinidade, o trabalho na seleção de clones torna-se ainda mais difícil (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011). Embora esses programas tenham trazido grandes contribuições ao setor sucroalcooleiro, a introdução de uma característica por retrocruzamentos frequentemente inclui outras não desejadas, o que demanda grandes esforços para a eliminação desses genes (RICHARDS, 1996).

Nas últimas décadas, com o aumento da importância socioeconômica e agroindustrial da cultura para o país, houve um maior incentivo em áreas da biotecnologia ainda pouco exploradas. O melhoramento genético da cana-de-açúcar tem experimentado a incorporação de ferramentas biotecnológicas como a transgenia no desenvolvimento de novas cultivares. Através da tecnologia do DNA recombinante eliminam-se barreiras de incompatibilidade de cruzamento entre as espécies permitindo a introdução de novos genes - novas características – de forma controlada ao pool gênico da espécie. Além disso, a transformação genética pode auxiliar na descoberta das funções gênicas e na elucidação dos processos desencadeados na planta submetida ao déficit hídrico (D’HONT *et al.*, 1996, 1998; HA *et al.*, 1999).

Os métodos para a transformação genética de cana já foram relatados décadas atrás. Os primeiros experimentos de transformação genética em cana foram realizados no final dos anos 80 (CHEN *et al.*, 1987), quando um gene de resistência à canamicina foi introduzido em protoplastos por electroporação e tratamento com polietileno-glicol. Plantas transformadas também foram produzidas por meio de bombardeamento de partículas (biobalística) em suspensão de células e calos embriogênicos (BOWER & BIRCH, 1992). Sun *et al.* (1993) obtiveram plantas resistentes ao herbicida glufosinato de amônio através de biobalística

usando o gene *bar*, que codifica a enzima fosfinotricina-acetiltransferase. Ainda, Arencibia *et al.* (1995) relataram um procedimento estável de transformação com tecido meristemático utilizando eletroporação.

Muitos estudos têm demonstrado que a transformação via *Agrobacterium* e o bombardeamento de partículas são os métodos de transformação mais eficientes para transformação de cana para produzir variedades comerciais (BOWER & BIRCH, 1992; ARENCIBIA *et al.*, 1998; JOYCE *et al.*, 2010). Com isso, vários genes de interesse comercial tem sido introduzido na cana de açúcar por transformação genética, conferindo tolerância a herbicidas (ENRIQUEZ-OBREGON *et al.*, 1998; FALCO *et al.*, 2000; MANICKAVASAGAM *et al.*, 2004), resistência a doenças (INGELBRECHT, IRVINE & MIRKOV, 1999; ZHANG *et al.*, 1999; ENRIQUEZ *et al.*, 2000; McQUALTER *et al.*, 2004; GILBERT *et al.*, 2005, 2009; ZHU *et al.*, 2011) e pragas (ARENCIBIA *et al.*, 1997; SETAMOU *et al.*, 2002; FALCO & SILVA-FILHO, 2003; CHRISTY *et al.*, 2008; ARVINTH *et al.*, 2010; WENG *et al.*, 2011), tolerância à estresses abióticos (ZHANG *et al.*, 2006; MOLINARI *et al.*, 2007; BELINTANI *et al.*, 2012), aumento do teor de sacarose, e melhorias na qualidade de açúcar e cor (SANTOS *et al.*, 2004; VICKERS *et al.*, 2005; WU & BIRCH, 2007; GROENEWALD & BOTHA, 2008).

A manipulação genética para a produção de cultivares transgênicas de cana-de-açúcar já é realizada há alguns anos no Brasil. Mais de 40 processos visando a condução de ensaios de campo, com a liberação planejada, de cana-de-açúcar geneticamente modificada já foram aprovados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), para materiais que contém genes conferindo maior conteúdo de sacarose, tolerância à herbicidas, resistência ao ataque de insetos e tolerância à seca (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011). Por questões de análises de biossegurança, nenhuma variedade foi liberada para plantio comercial até o momento. No entanto, uma série de trabalhos já foram publicados por grupos brasileiros sobre o desenvolvimento de materiais geneticamente modificados, alguns exemplos como, maior tolerância a insetos-praga (BRAGA *et al.*, 2003; FALCO E SILVA-FILHO, 2003), tolerância a seca e salinidade (MOLINARI *et al.*, 2007; GUERZONI *et al.*, 2014) e a baixas temperaturas (BELINTANI *et al.*, 2012).

2.2. Estresses abióticos

2.2.1 Estresse hídrico em cana-de-açúcar

Estresses abióticos, tais como seca, salinidade e baixas temperaturas, causam grandes perdas na agricultura, não sendo a cultura da cana-de-açúcar uma exceção. A cana de açúcar (*Saccharum spp.*) é cultivada em quase todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo, incluindo as regiões onde a disponibilidade de água é limitada (AZEVEDO *et al.*, 2011). No Brasil e no mundo, dentre estes fatores, o déficit hídrico afeta uma grande parte das áreas de canavial e é o que mais influencia de forma negativa a produtividade da cana (JANGPROMMA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014). O sistema radicular é o primeiro órgão da planta a ser afetado pela baixa disponibilidade de água no solo. Em cana seus efeitos interferem nas taxas de assimilação de CO₂, no tamanho das células foliares, na transpiração, no potencial de água da planta, no crescimento e na condutância estomática (RIBEIRO *et al.*, 2013). Além disso, o estresse hídrico influencia de maneira direta no crescimento, nos perfilhos e na altura final dos colmos e, conseqüentemente, na produção de açúcar, provocando a perda significativa de rendimento, principalmente quando o estresse hídrico ocorre nas fases iniciais de crescimentos (GASCHO & SHIH, 1983; MACHADO *et al.*, 2009).

Plantas de cana-de-açúcar necessitam de umidade disponível no solo durante o período de crescimento. Porém, durante a maturação, o ideal é que haja redução na água disponível, não drasticamente, mas o suficiente para reduzir o crescimento e induzir a maior concentração de açúcar nos colmos. A maioria das regiões canavieiras do país apresenta um volume adequado de chuvas para a cultura, o qual é estimado entre 1200 e 1500 mm anuais (OMETO, 1980). Entretanto, o mais importante é a distribuição pluviométrica adequada e esta é bastante irregular. A maior demanda de água é no período de rápido crescimento da planta e completa área foliar (GOUVÊA, 2008). Inman-Bamber & Smith (2005) afirmam que no período de alongação do colmo seria o ponto crítico, onde o déficit hídrico causa quedas na produção de fitomassa e sacarose.

2.2.2 Alterações fisiológicas sob condição de seca

As plantas estão constantemente sujeitas a mudanças em seu ambiente, fazendo com que elas alterem o seu metabolismo para manter um equilíbrio entre a geração de energia e consumo. Este equilíbrio depende em grande parte de uma rede de sinalização que coordena três dos maiores processos críticos na vida das plantas: fotossíntese, respiração no escuro e

fotorrespiração, atividades estas ligadas com a transferência de elétrons, substrato, redutores e energia (NOCTOR *et al.* 2007; FOYER & NOCTOR, 2009).

A primeira resposta da planta ao déficit hídrico é a redução no crescimento e no desenvolvimento, devido à queda de expansão das células. (INMAN-BAMBER *et al.*, 2008; WILKINSON & DAVIES, 2010). A deficiência de água acarreta não apenas uma diminuição de água nos tecidos e uma desidratação das células, mas também um desbalanço nutricional, estresse osmótico e estresse de calor, este causado pelo decréscimo da transpiração. Esses fatores dificultam a avaliação e seleção dos melhores genótipos para o estresse hídrico. Além disso, períodos de déficit hídrico no solo podem ocorrer a qualquer momento durante o crescimento da planta e nem todas as fases do desenvolvimento são igualmente sensíveis ao estresse (LOPES *et al.* 2011). Por exemplo, na cana-de-açúcar períodos de seca quando todas as folhas já estão estabelecidas tem impactos mais graves sob o potencial de rendimento em termos de biomassa total, biomassa de colmo e sacarose do que no início do crescimento da planta (ROBERTSON *et al.*, 1999).

A diminuição da perda de água é um mecanismo fisiológico que é controlado pelo fechamento parcial ou total dos estômatos, resultando em uma mudança no status da água na folha que está diretamente relacionada na assimilação de carbono e nas taxas fotossintéticas (BENESOVÁ *et al.*, 2012). À medida que o potencial hídrico da planta diminui as taxas fotossintéticas também diminuem. Estudos mostraram a diminuição da atividade de enzimas como a carboxilase de ribulose-1,5-bifosfato (Rubisco), fosfoenolpiruvato-carboxilase (PEPC), NADP enzima málico (NADP-ME), ortofostato diquinase (PPDK), com o decréscimo do potencial de água na folha (DU *et al.*, 1998).

A capacidade de tolerância à seca deve-se aos mecanismos de tolerância encontrados pelas plantas como a aceleração do ciclo de vida e estratégias de escape (LEVITT, 1972; CHAVES *et al.*, 2003). Estas estratégias dependem muitas vezes do sucesso de reprodução antes do início do estresse severo, altas taxas de crescimento juntamente com o armazenamento eficiente e uso de reservas para a produção de sementes (CAMPOS *et al.*, 2004). Mecanismos para prevenção da desidratação envolvem uma manutenção do status da água na planta durante o estresse. Estas estratégias minimizam a perda de água tais como fechamento de estômatos, reduzir a área foliar, senescência de folhas velhas, ou mesmo o aumento da profundidade de raiz para encontrar água disponível (ARAUS *et al.*, 2008; BLUM, 2009, 2011).

Estudos sugerem que os efeitos adversos da seca podem ser evitados com a formação de um sistema radicular profundo, antes da escassez de água (JORDAN *et al.*, 1983; LOPES & REYNOLDS 2010). Sistemas radiculares profundos têm uma vantagem quando a água está disponível no fundo do perfil do solo, mas não em solos rasos (SPONCHIADO *et al.*, 1989). Uma relação positiva entre ramificação radicular e produtividade não foi relatada em condições de seca, no entanto uma relação positiva foi observada entre baixa massa seca de raiz e o aumento de crescimento da espiga do milho tropical em condições de seca (BOLANOS & EDMEADES, 1993). Estes resultados sugerem que a distribuição espacial da raiz no solo define a capacidade de um sistema radicular absorver água e não a sua massa total (TARDIEU *et al.*, 1992)

Algumas estratégias para aumentar o potencial de rendimento através da adaptação ao estresse hídrico podem ser empregadas para aperfeiçoar o rendimento total tais como: o aumento do potencial produtivo através do aumento da taxa de transpiração, ou seja, a retenção de pigmentos de clorofila em tecidos fotossintetizantes mantendo uma área foliar verde até o final do ciclo (LOPES *et al.*, 2011). Aumentos na produtividade podem ser alcançados com o maior acúmulo de biomassa sob déficit hídrico moderado. Manter o crescimento e acúmulo de biomassa, reduzir o ciclo da cultura, ou seja, um ajuste fenológico para escapar do período de seca. Porém esta estratégia provou ser mais bem-sucedido para plantas C3, tais como o trigo ou cevada na região do Mediterrâneo, que passam por períodos de seca no final do crescimento (ARAUS *et al.*, 2002). E a redução da área foliar ou condutância estomática, características que muitas vezes aumentam o uso eficiente da água, ou seja, a quantidade de biomassa colhida por unidade de água transpirada (LOPES *et al.*, 2011).

A tolerância das plantas a condições limitadas de disponibilidade da água requer a manutenção das funções de plantas e/ou a recuperação rápida das funções após o estresse, exigindo um ajustamento osmótico que pode envolver a rigidez das paredes das células (CHAVES *et al.*, 2003). As espécies e os genótipos de plantas respondem diferentemente à seca (HALL *et al.*, 1982; CAMPOS *et al.*, 2004). A natureza da resposta é influenciada pelo tempo e severidade da perda de água (YANG *et al.*, 1993; PINHEIRO & CHAVES, 2011), a idade e estágio de desenvolvimento, bem como o órgão no momento da exposição a seca (CHIMENTI *et al.*, 2006; DOURADO, 2013).

2.2.3 Mecanismos moleculares e bioquímicos de tolerância ao estresse hídrico

O entendimento de como as plantas responde aos estresses ambientais é fundamental para a sustentabilidade de sistemas agrícolas. A resposta fisiológica para o estresse hídrico vem de mudanças na expressão gênica. Embora muitos genes tenham sido identificados e caracterizados, principalmente em *Arabidopsis thaliana* (SHINOZAKI *et al.*, 2003), os papéis adaptativos desses genes no estabelecimento da tolerância não são claros (OLIVER *et al.*, 2004). Além disso, muitos genes são induzidos durante as respostas à desidratação e também durante outros estresses como a baixa temperatura e salinidade, demonstrando clara sobreposição nas vias de defesa. As proteínas induzidas pelo estresse podem ser classificadas em dois grandes grupos: aquelas que protegem a planta contra os estresses ambientais e aquelas que regulam a expressão gênica e a transdução de sinais de resposta a estresses (HASEGAWA *et al.*, 2000; SEKI *et al.*, 2003).

O primeiro grupo consiste nas proteínas funcionais, como as proteínas de membrana, enzimas para biossíntese de osmólitos (prolina, betaína e açúcares), enzimas de detoxificação celular (glutathione S-transferase, catalases, superóxido dismutases e ascorbato peroxidase) e proteínas de proteção de macromoléculas (proteínas LEA, osmotinas, proteínas anticongelamento, chaperonas). O segundo grupo compreende as proteínas regulatórias, como os fatores de transcrição (*bZIP*, *MYC*, *MYB* e *DREB*, entre outros), proteínas quinases (MAP quinases, CDP quinases, receptores de proteínas quinases, proteínas-ribossomais quinases e proteínas quinases de regulação-transcrição) e proteinases (fosfoesterases e fosfolipase C, entre outras) (SEKI *et al.*, 2003; ATKINSON & URWIN, 2012).

O estresse hídrico também é sinalizado por mudanças na concentração do cálcio celular, as quais seriam percebidas tipicamente por proteínas de ligação ao cálcio. Um exemplo dessas proteínas, que ocorre como uma família gênica é a caucineurina B (CBL). Um membro da família, CBL1, é altamente induzido por múltiplos sinais de estresse em *Arabidopsis* (CHEONG *et al.*, 2003).

O componente responsável pela detecção da turgescência ainda não é conhecido em plantas (RAMANJULU & BARTELS, 2002), mas há alguns genes candidatos para essa função. Em *Arabidopsis thaliana* caracterizou-se um gene homólogo (*ATHK1*) a um osmosensor (*SLNI*), conhecido por ativar a via de sinalização do estresse osmótico em levedura (URAO *et al.*, 1999). O *SNLI* é um gene que pertence à classe dos sistemas de dois

componentes (MAEDA *et al.*, 1994). Assim, o estresse hídrico pode ser percebido por osmosensores que detectam o estresse osmótico promovido pela desidratação.

Uma resposta comum à deficiência hídrica é o comprometimento da fotossíntese, que fica limitada pelo fechamento dos estômatos (CHAVES *et al.*, 2008) e pelas reações bioquímicas (LAWLOR & TEZARA 2009). Com a baixa taxa fotossintética aumenta a energia da luz excessiva, alterando o estado redox nos cloroplastos gerando o estresse oxidativo. Até certo nível de produção de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) pode funcionar como um sinalizador de estresse e desencadear respostas de defesa através de vias de transdução (CRUZ DE CARVALHO, 2008; MILLER *et al.*, 2010). Por longos níveis de exposição à ROS, este pode ter efeitos deletérios para a célula de plantas. ROS e a atividade de enzimas antioxidante tendem a aumentar nos tecidos de plantas submetidas a seca (JIANG & ZHANG, 2002). Nessa condição, as plantas desenvolveram mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para eliminar as espécies reativas de oxigênio (ROS) que são gerados (AZEVEDO *et al.* 2011; IMPA *et al.*, 2012).

As vias metabólicas em organelas vegetais são sensíveis às mudanças nas condições ambientais, que podem levar a um desequilíbrio metabólico, induzir estresse oxidativo nas células, promovendo a geração e acúmulo de ROS, provocando a oxidação de componentes celulares, dificultando as atividades metabólicas e afetando a integridade das organelas (BUCHANAN & BALMER, 2005; MOLLER *et al.*, 2007; MUELLER & BERGER, 2009; MOLLER & SWEETLOVE, 2010). ROS são produzidas continuamente pelo metabolismo celular e as células das plantas produzem antioxidantes e enzimas que removem as ROS em condições normais de crescimento.

Entretanto, estresses abióticos podem aumentar a taxa de produção de ROS e diminuir a capacidade antioxidativa das células, levando ao acúmulo de ROS (MILLER *et al.*, 2010; DIETZ, 2011). Uma consequência do estresse hídrico é a limitação da fotossíntese que leva à produção de ROS nos cloroplastos e causando um efeito fitotóxico nas plantas (CRUZ DE CARVALHO, 2008). É necessário um elevado nível de coordenação metabólica para manter o fluxo de energia através dessas organelas e evitar a produção excessiva de ROS e os danos oxidativos, incluindo a regulação redox reversível de proteínas, a regulação das fosfoproteínas, a ativação de vias de sinalização responsivas a ROS, genes reguladores e removedores de ROS (NOCTOR *et al.*, 2007; FOYER & NOCTOR, 2009; FOYER *et al.*, 2009; MILLER *et al.*, 2010; DIETZ, 2011).

Para se proteger contra os efeitos prejudiciais de ROS produzidos durante o estresse oxidativo, as plantas têm um complexo sistema de defesa com antioxidante de baixo peso molecular, tais como moléculas hidrofílicas (ácido ascórbico e glutathiona), as moléculas lipofílicas (alfa-tocopherol e carotenoides), e enzimas antioxidante tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), não específica peroxidase (POX), glutathiona redutase (GR), e monodehydroascorbate redutase (MDHA), que atuam na redução de ROS, mitigando os danos oxidativos na célula vegetal (MITTLER, 2002; SHARMA *et al.*, 2012).

A transdução de sinais disparada por ROS pode induzir a expressão de genes de defesa, tais como proteínas de choque termico (HSP), glutathione-S-transferases (GST), peroxidases, superoxide-dismutases e proteínas relacionadas à patogenicidade (PR), protegendo a planta dos danos (KOVTON *et al.*, 2000). A regulação de genes que codificam para poliaminas oxidase, citocromo-c-oxidase, S-adenosilmetionina (SAM) descarboxilase e tiorredoxinas, que participam direta ou indiretamente na regulação intracelular do estado redox, tem sido relatada em cana-de-açúcar, podendo contribuir para a tolerância ao déficit hídrico (PRABU *et al.*, 2011). Rodrigues *et al.* (2009) demonstraram um aumento na expressão de um gene que codifica uma peroxidase em uma variedade de cana tolerante à seca quando submetida a estresse hídrico. De um modo semelhante à catalase (CAT), esta enzima é responsável pela redução de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Um declínio na atividade da peroxidase é considerado um passo limitante na neutralização de ROS em cana (CHAGAS *et al.*, 2008). O acúmulo dos osmólitos trealose e prolina, também contribui para a redução do dano causado pelo acúmulo de ROS e está associado com a tolerância à seca em cana (ZHANG *et al.*, 2006;. MOLINARI *et al.*, 2007;. GUIMARÃES *et al.*, 2008). O aumento do acúmulo de prolina sob estresse hídrico sugere que este aminoácido pode estar envolvido no mecanismo de regulação osmótica e de defesa antioxidante, contribuindo para o equilíbrio ROS nas folhas, como relatado em estudos anteriores em a cana sob estresse hidrico (MOLINARI *et al.*, 2007; CIA. *et al.*, 2012; HEMAPRABHA *et al.*, 2013).

A resposta à seca é mediada pelo fitormônio ácido abscísico que sinaliza e regula o equilíbrio da água na planta (RIERA *et al.*, 2005; WILKINSON & DAVIES, 2010). Trujillo e colaboradores (2008) mostraram que o gene *SodERF3*, responsivo a etileno em cana, foi induzido por ABA e estresse hídrico e pode estar envolvido na tolerância à salinidade e à seca.

Os estresses abióticos raramente manifestam-se isoladamente. Seca, sal e temperaturas estão intimamente relacionados e os efeitos fisiológicos se sobrepõem (KRÁSENSKÝ & JONAK, 2012). Comumente as temperaturas elevadas, por exemplo, vêm com a seca e o déficit de água, agravando os efeitos do estresse osmótico nas células das plantas (BITA & GERATS, 2013). Como resultado, uma complexa rede de sinalização ativa as vias de sinalização para permitir que as plantas sobrevivam. A sobrevivência das plantas sob múltiplas e simultâneas condições ambientais implica em processos complexos de recepção, amplificação, transmissão e interação de sinais. A transmissão de sinais é uma complexa atividade de comunicação que envolve moléculas em diferentes níveis de organização. O grande número de genes responsivos ao estresse descreve essa complexidade das plantas para se adaptar às diversas e adversas condições (MOUSTAFA *et al.*, 2014).

Estudos bioquímicos e de transcrição têm relatado o envolvimento das MAP quinases em resposta à seca em plantas. Em ensaios de expressão transiente, Hua *et al.* (2006) descobriram que a expressão constitutiva da *MPK* e *MKK* de *Arabidopsis* são capazes de ativar o promotor RD29, um gene responsivo à desidratação, sugerindo que a cascatas da MAP quinases estão envolvidos na sinalização a seca.

A análise da regulação da transcrição de 44 MAP quinases sob diferentes estresses abióticos demonstrou que *MPK2*, *MPK3*, *MPK4*, *MPK5*, *MPK12* e *MAPKKK4* de *Arabidopsis* são induzidas pelo estresse hídrico (MOUSTAFA *et al.*, 2008). Na cultura de arroz (*Oryza sativa*), Ning *et al.* (2010) identificaram uma proteína RAF-like MAPKKK, chamado DSM1 (mutante sensível a seca 1) que funciona como um removedor de ROS, aumentando a tolerância das plantas à desidratação sob estresse hídrico. Também em *Arabidopsis*, foi demonstrado que a MAP quinase *MPK6* aumenta a tolerância das plantas à desidratação através da regulação da atividade do RNA *decapping* (XU & CHUA, 2012).

A tolerância à seca em arroz também foi demonstrada pela superexpressão da MAP quinase *OsMAPK5*, um ortólogo de *Arabidopsis MPK3* (XIONG & YANG, 2003). A indução de outra MAP quinase de arroz, *OsMSRMK2*, foi observada no prazo de 15 min em resposta à seca (AGRAWAL *et al.*, 2002), sugerindo papéis funcionais do *OsMSRMK2* na sinalização do estresse hídrico. Além disso, cinco dos dez membros da família MAPKK em arroz são relatados como regulados pela seca (KUMAR *et al.*, 2008).

Em milho, uma MAP quinase, *ZmMPK3*, foi identificado como um gene responsivo a seca (WANG *et al.* 2010), e a transformação genética com MAPKKK de tabaco (*NPKI*) aumentou a tolerância do milho à seca (SHOU *et al.*, 2004). ZHANG *et al.* (2011)

identificaram uma MAP quinase do algodão a *GhMPK2* que funciona na redução da perda de água e ajustar a pressão osmótica sob condições de seca. Outra MAP quinase do algodão, *GhMPK16* foi identificado como um gene de resposta a seca (SHI *et al.*, 2011). Em análise celular ambos *GhMPK2* e *GhMPK16* translocam para o núcleo, sugerindo que ambas as quinases são potenciais ativadores de fatores de transcrição que funcionam sob condições de seca. No entanto, a resposta da planta à seca é um fenômeno complexo, especialmente com um genoma poliplóide como a cana-de-açúcar (GRIVET & ARRUDA 2001), além do fato de que o estresse hídrico envolve redes bioquímicas que ainda estão sendo elucidadas. Por exemplo, o fornecimento de fósforo melhorou a capacidade de aclimação da cana sob déficit hídrico, melhorando o seu potencial de rendimento e desempenho fotossintético (SATO *et al.*, 2010).

2.3 Gene *NP1* (MAPKKK) de *Nicotiana*

As plantas quando expostas a vários estresses abióticos, como a seca, salinidade, temperatura alta ou baixa, e intensidade de luz, elas desencadeiam uma complexa rede de sinalização. As células respondem a esses sinais através da alteração da expressão de genes e a produção de proteínas que estão envolvidas na tolerância ao estresse, e, assim, promovem respostas morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (PASTORI & FOYER, 2002).

Mudanças no estado de fosforilação das proteínas sob condições de estresse indicam o envolvimento da transmissão de fosfato reversível na regulação da transmissão do sinal (PASTORI & FOYER, 2002). Fosfatases são enzimas capazes de causar mudanças no estado de fosforilação, ativando ou desativando a atividade da proteína. Em *A. thaliana*, *AtPP2CA* é uma fosfatase 2C que regula respostas da via dependente de ABA, sendo induzida por baixa temperatura, pela desidratação e salinidade. *AtPP2CA* regula a atividade de canais de K⁺, como as proteínas *AtK2* (CHEREL *et al.*, 2002) e *AKT3* (VRANOVA *et al.*, 2001). Outro gene relacionado à transmissão de sinais via fosforilação, *rpk1*, codifica uma proteína receptora quinase de *A. thaliana* que é rapidamente induzida por desidratação, alta salinidade e baixa temperatura (HONG *et al.*, 1997), e pode estar implicada na sinalização precoce da defesa contra o estresse hídrico.

As proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) formam uma cascata que amplifica o sinal da via oxidativa da transdução de sinais têm sido consideradas universal e regula várias atividades celulares, tais como a divisão celular, diferenciação e morte celular. (TENA *et al.*, 2001) (Figura 1). A cascata de sinalização MAPK é conservada evolutivamente

nos eucariontes, incluindo leveduras, animais e plantas. A MAP kinase três de alfafa (MMK3) pode ser encontrado durante todas as fases do ciclo celular, mas a sua atividade como proteína quinase foi detectada apenas nas células em mitose, sugerindo que o seu papel seja na regulação da citocinese em plantas (LÁSZLÓ *et al.*, 1999).

Uma cascata MAPK consiste em três classes de proteínas quinases organizados hierarquicamente, ou seja, a MAP quinase quinase quinase (MAPKKK), MAP quinase quinase (MAPKK) e MAP quinase (MAPK). Estas quinases funcionam como transdutores de sinais que integram a informação do ambiente celular para a transcrição de resposta metabólicas através de fosforilação. MAPK são ativadas por MAPKKs através da fosforilação do *motif* conservado da treonina e tirosina Thr-X-Tyr (T-X-Y) que está localizado no *loop* de ativação ((T-loop) entre os subdomínios catalíticos VII e VIII. MAPKKs, por sua vez, são ativadas por MAPKKKs no *motif* da serina com o resíduo da serina/treonina S/TXXXXXS/T são fosforiladas (TENA *et al.*, 2001).

Ichimura *et al.* (1998) e Mizoguchiet *et al.* (1998) identificaram a primeira cascata MAPK em plantas: AtMEKK1 - AtMEK1 - AtMPK4, e comprovaram que esta cascata pode sinalizar resposta a seca e injúrias em ensaios com híbrido de leveduras. Comparado com as MPKs e as MPKKs, a família MAPKKK tem muitos membros e uma maior variedade na sua estrutura primária e na composição do domínio. A análise nas sequências de aminoácidos do domínio catalítico da proteína quinase mostra que MAPKKKs de *Arabidopsis* se dividem em duas classes principais: MEKKs tais como MEKK1 / STE11 / BCK1 e RAF-like. Homólogos de MAPKKKs foram identificados em espécies de plantas, incluindo os MEKKs proteínas kinases, tais como: OMTK1 (ativada pelo estresse oxidativo MAP tripla quinase 1) de alfafa (NAKAGAMI *et al.*, 2004), as ANP1, ANP2, ANP3 (KOVTUN *et al.*, 2000), YDA (LUKOWITZ *et al.*, 2004) de *Arabidopsis*, a NPK1 (Nicotiana proteína quinase 1) de tabaco (NISHIHAMA *et al.*, 2001). E as RAF-like proteínas quinases, EDR1 (resistência à doença 1), e CTR1 (resposta tripla constitutiva 1) de *Arabidopsis* (KIEBER *et al.*, 1993; FRYE *et al.*, 2001)

A família MAPK já foi identificada em várias plantas. No genoma de *A. thaliana* foi identificado genes que codificam para 20 MAPK, 10 MAPKK, e 80 MAPKKK (JONAK *et al.*, 2002; ICHIMURA *et al.*, 2002), enquanto que o genoma do arroz contém genes para 17 MAPK, 8 MAPKK, e 75 MAPKKK (ROHILA *et al.*, 2007; RAO *et al.*, 2010). Estudos demonstraram que 19 MAPK, 9 MAPKK, e 74 MAPKKK genes podem ser encontrados no milho (LIU *et al.*, 2013; KONG *et al.*, 2013). Em tabaco foram identificados 17 MAPKs,

incluindo 11 genes. Em análise comparativa com as famílias de genes de MAPK de outras plantas, mostrou que as MAPKs de tabaco (NtMPK1, NtMPK3 e NtMPK8) podem desempenhar respostas semelhantes a estresses bióticos e abióticos (ZHANG *et al.*, 2013).

Especificamente em relação à quinase 1 de *Nicotiana* (*NPK1*), este gene é encontrado naturalmente em plantas de tabaco, sendo homólogo ao gene *ANP1* de *A. thaliana*. Este gene é ativado na presença dos H_2O_2 e inicia uma cascata metabólica de proteínas quinases ativadas por MAPKs. A cascata MAPK geralmente funciona em resposta a estresses osmóticos que ocorrem nas plantas em condições extremas de seca e temperatura (MIZOGUCHI *et al.*, 1996). Um estudo conduzido por Kovtun *et al.* (2000) encontrou que o gene homólogo ao *NPK1* (*ANP1*) ativou dois MAPKs endógenos.

É interessante notar que a expressão heteróloga constitutiva de um fragmento de 268 aminoácidos da MAPK quinase quinase (MAPKKK) de tabaco (denominado *NPK1*) induziu a tolerância à seca (SHOU *et al.*, 2004a) e a baixas temperaturas em milho transgênico (SHOU *et al.*, 2004b), demonstrando seu potencial na produção de plantas geneticamente modificadas de outras espécies visando a tolerância a estresses abióticos.

Algumas MAPKs estão envolvidas com a resposta à desidratação, em uma via dependente de ABA (KOVTURN *et al.*, 2000). Essas MAPKs podem estar relacionadas com a produção de ROS, gerando assim o estresse oxidativo, o qual possui várias atividades na célula, como a lignificação, ativação da via do ácido jasmônico, entre outras (Fig. 1) (INZÉ & VAN MONTAGU, 1995).

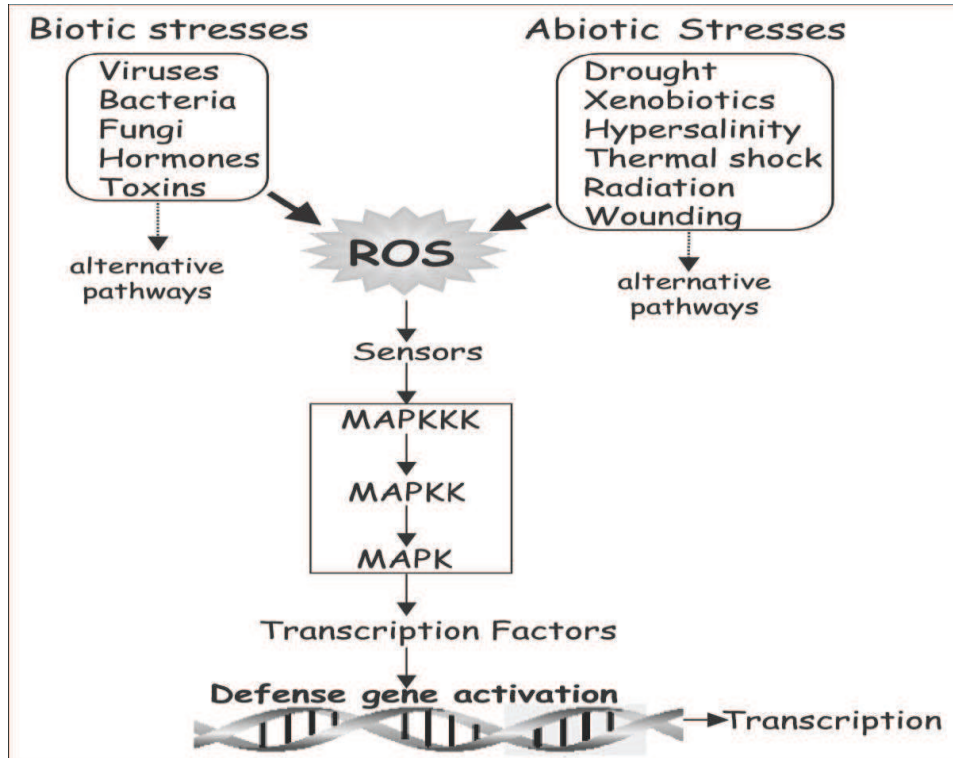


Figura 1: Convergência de sinais de estresses abióticos e bióticos para proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) via espécies reativas de oxigênio (ROS) como fator comum para a ativação de genes de defesa antioxidativa (SCANDALIOS, 2005).

Ensaio de imunoprecipitação contra diferentes quinases de alfafa mostraram que a expressão e atividade da quinase p44MKK4 foi ativada em condições de seca (JONAK *et al.*, 1996). Estudos em *Arabidopsis* descobriram que a expressão do AtMEKK1 e AtMPK3 pode ser induzida pela seca (MIZOGUCHI *et al.*, 1996). Estresse hídrico também ativa os OsMSRMK2 e OsMAPK5 em plantas de arroz (XIONG & YANG, 2003). A superexpressão do DSM1 em arroz (MAPKKK um gene putativo de arroz) aumentou a tolerância ao suprimento de água (NING *et al.*, 2010). Peng *et al.* (2006), investigou os padrões de expressão de MaMAPK e mostrou que a atividade de MAPK pode ser um dos mecanismos moleculares de diferentes tolerância à seca em *Malus L.* Em milho, a ZmMPK3 também desempenha um papel importante na resposta a estresses ambientais incluindo a seca (WANG *et al.*, 2010). Uma caracterização fisiológica e molecular de ZmMKK1 em plantas de *Arabidopsis*, demonstrou que a sua superexpressão aumentaria a tolerância aos estresses salino e hídrico, através do fechamento dos estômatos ou removendo ROS. Além disso, a superexpressão de ZmMKK1 no tabaco conferiu a tolerância ao estresse de frio e participou de respostas em defesa a fitopatógenos (CAI *et al.*, 2014).

2.4. Promotor constitutivo 35SC4PPDK

A maioria dos estudos com a superexpressão de genes exógenos para aumentar a tolerância aos estresses abióticos em plantas utiliza promotores constitutivos (SU & WU, 2004). O promotor viral *CaMV35S*, isolado do vírus do mosaico da couve-flor, é um dos mais utilizados para direcionar alto nível de expressão constitutiva em plantas (ODELL *et al.*, 1985). Entretanto, seu funcionamento em monocotiledôneas não é tão eficiente quanto em dicotiledôneas. O promotor mais utilizado para direcionar a expressão de uma proteína constitutivamente em monocotiledônea é o promotor isolado do gene da ubiquitina de milho (*Ubi1*) (CHRISTENSEN & QUAIL, 2005).

Tem sido relatado que em alguns casos, a superexpressão constitutiva de transgenes dificulta o crescimento das plantas podendo reduzir a sua produtividade (KARIM *et al.*, 2007). Em condições normais de crescimento, a superexpressão do transgene pode concorrer pela energia e esqueletos de carbono da planta, diminuindo a síntese de proteínas e RNAs que são necessários para o crescimento. A expressão constitutiva dos genes relacionados à resposta das plantas aos estresses causa um crescimento lento em plantas transgênicas (SODERMAN *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 1998). Os produtos destes genes, provavelmente interferem na divisão ou na maquinaria celular resultando na inibição do crescimento e, portanto, eles podem representar um “sinal de estresse”.

Por exemplo, a superexpressão de *NPKI*, membro da família MAPKKK, em tabaco resultaram em alguns efeitos prejudiciais sobre a divisão celular, embriogênese e desenvolvimento de semente (KOVTON *et al.*, 1998). Assim, dependendo do transgene, seria desejável gerar plantas que acumulassem os seus produtos transgênicos apenas sob condições de estresse e em baixas quantidades (RAI *et al.*, 2009). Também, a redução da eficiência de transformação de plantas de milho com o gene *NPKI* foi ligada à morte dos eventos com alta expressão deste gene durante o processo de seleção (SHOU *et al.*, 2004a; MUOMA & OMBORI, 2014).

Para evitar os efeitos deletérios da alta expressão de transgenes, um fragmento de MAPKKK de tabaco (*NPKI*) foi expresso constitutivamente no milho através do promotor modificado 35SC4PPDK e seu efeito sobre a tolerância à seca foram avaliados (SHOU *et al.*, 2004a). Os resultados mostraram que a taxa de fotossíntese foi mantida em condições de seca no milho transgênico. Além disso, as plantas transgênicas apresentaram peso de semente semelhante às aquelas não transgênicas e irrigadas (SHOU *et al.*, 2004a). O promotor 35SC4PPDK é resultante

da fusão das sequências do promotor basal, do sítio de iniciação da transcrição e da região 5' não traduzida do gene C4 de cloroplasto de milho PPDK (piruvato citosólico não-C4, diquinase ortofosfatase) (C4ppdkZm1) (SHEEN, 1990, 1991; SCHAFFNER & SHEEN, 1991, 1992) com as sequências do 35S,

3. REFERÊNCIAS

ABLE, A. J., SUTHERLAND, M. W., GUEST, D. I. Production of reactive oxygen species during non-specific elicitation, non-host resistance and field resistance expression in cultures of tobacco cells. **Functional Plant Biology**. v. 30, p. 91- 99, 2003.

AGRAWAL GK.; RAKWAL R.; IWAHASHI H. Isolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive MAP kinase gene, OsMSRMK2, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 294, p. 1009–1016, 2002.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Plant Biology**. v. 55, p. 373–99, 2004.

ARAUS, J. L.; SLAFER, G. A.; REYNOLDS, M. P.; ROYO, C. Plant breeding and water stress in C3 cereals: what to breed for? **Annals of Botany**. v. 89, p. 925–940, 2002.

ARAUS, J. L.; SLAFER, G. A.; ROYO, C.; SERRET, M. D. Breeding for yield potential and stress adaptation in cereals. **Critical Reviews in Plant Science**. v. 27, p. 1–36, 2008

ARENCIBIA, A. D.; CARMONA E R.; TELLEZ P.; CHAN M-T.; YU S-M.; TRUJILLO L. E.; ORAMAS P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, v. 7, n. 3, p. 213-222, 1997.

ARENCIBIA, A.; MOLINA P.; DE LA RIVA, G.; SELMAN-HOUSSEIN, G. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. **Plant Cell Reports**. v. 14, p. 305–309, 1995.

ARRUDA, P. Perspective of the Sugarcane Industry in Brazil. **Tropical Plant Biology**. v.4, p.3-8, 2011.

ARVINTH S, ARUN S, SELVAKESAVAN RK, SRIKANTH J, MUKUNTHAN N, KUMAR PA, PREMACHANDRAN M. N, SUBRAMONIAN N. Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with *cry1Ab* for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. **Plant Cell Reports**, v. 29, p. 383-395, 2010.

ASHRAF, M.; FOOLAND, M. R. Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environment and Experimental Botany**. v. 59, p. 206-216, 2007.

- ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**. v. 63, n. 10, p. 1-21, 2012..
- AZEVEDO, R. A.; CARVALHO, R. F.; CIA, M. C.; GRATAO, P. L. Sugarcane under pressure: An overview of biochemical and physiological studies of abiotic stress. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 42–51, 2011.
- BAXTER, C. J.; REDESTIG, H.; SCHAUER, N., *et al.* The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress. **Plant Physiology**. v. 143, p. 312–325, 2007.
- BELINTANI, N. G.; GUERZONI, J. T. S; MOREIRA, R. P.; VIEIRA, L. G. E. Improving low-temperature tolerance in sugarcane by expressing the isopentenyltransferase (ipt) gene under control of a cold induced gene promoter. **Biologia Plantarum**, v. 56 (1), p. 71-77, 2012.
- BELKHODJA, R.; MORALES, F.; ABADÍA, A. Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiology**. v.104, p. 667-673, 1994.
- BENESOVÁ, M.; HOLÁ, D.; FISCHER, L.; JEDELSKY, P.L.; HNILICKA, F.; WILHELMOVÁ, N.; ROTHOVÁ, O.; KOCOVÁ, M.; PROCHÁZKOVÁ, D.; HONNEROVÁ, J.; FRIDRICHÓVA, L.; HNILICKOVÁ, H. The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? **Plos one**. v. 7, e. 38017, 2012.
- BIOSEV - A LOUIS DREYFUS COMMODITIES COMPANY. 2013. Setor Sucroalcoleiro. http://ri.biosev.com/biosev/web/conteudo_pt.asp?idioma=0&conta=28&tipo=30884 Acesso em: dez. 2014.
- BITA, C. E.; GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Front Plant Science**. v. 4:p. 273, 2013.
- BLUM, A. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. **Field Crops Research**. v. 112, p. 119–123, 2009.

- BLUM, A. Plant breeding for water-limited environments. **Berlin: Springer**. 2011.
- BOARETTO, L. F., MAZZAFERA, P. The proteomes of feedstocks used for the production
- BOHNERT H, J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Science. Horticultural**. v. 78, p. 237–260, 1999.
- BOLANOS, J.; EDMEADES, G. O. Eight cycles of selection from drought tolerance in lowland tropical maize. II. Responses in reproductive behavior. **Field Crops Research**. v. 31, p. 253–268, 1993.
- BORSANI, O.; ZHU, J.; VERSLUES, P. E.; SUNKAR, R.; ZHU, J. K. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cisantisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. **Cell**. v. 123, p. 1279–1291, 2005.
- BOWER R.; BIRCH R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant Journal**. v. 2, p.409–416, 1992.
- BOWER, R.; ELLIOT, A. R.; POTIER, B. A. M.; BIRCH, R. G. High-efficiency microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible markers. **Molecular Breeding**. v. 2, p. 239-249, 1996.
- BRAGA, D. P. V.; ARRIGONI, E. D. B.; SILVA-FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera : Crambidae). **Journal New Seeds**. v. 5, p. 209–222, 2003.
- BRAY E. A. Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. **Plant, Cell and Environment**. v. 25, p. 153–161, 2002.
- BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN B. B; GRUISSEM. W.; JONES R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1158-1203, 2000.
- BRESSAN, R. A.; BOHNERT, H. J.; HASEGAWA P. M. Genetic Engineering for Salinity Stress Tolerance. **Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology**. v. 1, p. 348-374, 2008.

BRESSAN, R. A.; ZHANG, C.; ZHANG, H.; HASEGAWA, P. M.; BOHNERT H, J.; ZHU, J. K. Learning from the Arabidopsis experience. The next gene search paradigm. **Plant Physiology**. v. 127, p. 1354–1360, 2002.

BUCHANAN B. B.; BALMER Y. Redox regulation: a broadening horizon. **Annual Review of Plant Biology**. v. 56, p. 187–220, 2005.

CAMPOS, H.; COOPER, A.; HABBEN, J. E.; EDMEADES, G. O.; SCHUSSLER, J.R. Improving drought tolerance in maize: a view from industry. **Field Crops Research**. v. 90, p. 19–34, 2004.

CHAGAS, R. M.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, R. V.; VITORELLO, V. A.; CARRER, H. Photochemical damage and comparative performance of superoxide superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 90, p.181–188, 2008.

CHAVES M. M., FLEXAS J., PINHEIRO C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annuary Botanic**. v. 103, p. 551-560, 2008.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**. v. 30, p. 239–264, 2003.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK, J. C. F.; 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.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. DE A.; MACEDO, N.; & MATSUOKA, S.; & REINACH, F. DE C.; ROMANO E.; DA SILVA W. J.; SILVA FILHO, M. DE C.; ULIAN E. C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**. v. 4, p. 62-89, 2011.

CHEN; W. H.; GARTLAND; K. M. A.; DAVEY; M. R.; SOTAK; R.; GARTLAND; J. S.; MULLIGAN; B. J.; POWER; J. B.; COCKING; E. C. Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimeric gene. **Plant Cell**. Rep v. 6; p. 297–301; 1987.

CHEONG; Y. H.; KIM; K.N.; PANDEY; G.K.; GUPTA; R.; GRANT; J.J.; LUAN; S. CBL1; a calcium sensor that differentially regulates salt; drought; and cold responses in *Arabidopsis*. **Plant Cell**; n.15; p.1833–1845; 2003.

CHÉREL; I.; MICHARD; E.; PLATET; N.; MOULINE; K.; ALCON; C.; SENTENAC; H.; THIBAUD; J. B. Physical and functional interaction of the *Arabidopsis* K⁺ channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. **Plant Cell**. v. 14; p. 1133-1146; 2002.

CHIMENTI; C. A.; MARCANTONIO; M.; HALL; A. J. Divergent selection for osmotic adjustment results in improved drought tolerance in maize (*Zea mays L.*) in both early growth and flowering phases. **Field Crops Research**. v. 95; p. 305–315; 2006.

CHRISTENSEN, A. H.; QUAIL, P. H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes monocotyledonous plants. **Transgenic Research**. v. 5, n. 3, p. 213-218, 2005.

CHRISTY, L. A. *et al.* Engineering sugarcane cultivars with bovine pancreatic trypsin inhibitor (aprotinin) gene for protection against top borer (*scirpophaga excerptalis* Walker). **Plant Cell Reports**, v. 28, n. 2, p. 175-184, 2008.

CIA, M. C; GUIMARA~ES, A. C. R; MEDICI, L. O; CHABREGAS, S. M; AZEVEDO, R. A. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annual Applied Biology**. v. 161; p. 313–324; 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2014. Cana-de-açúcar tem fechamento da safra 2013/14 e primeira estimativa da 2014/15. <www.conab.gov.br>. Acesso em: nov. 2014.

CRAMER; G. R. Response of abscisic acid mutants of *Arabidopsis* to salinity. **Functional Plant Biology**. v.29; p.561–67; 2002.

CRAMER; G. R.; LÄUCHLI; A.; POLITO; V. S. Displacement of Ca²⁺ by Na⁺ from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? **Plant Physiology**. v.79; p. 207-211; 1985.

CRUZ DE CARVALHO M. H. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. **Plant Signal Behav**. v. 3, p.156–65, 2008.

D'HONT A.; GRIVET; L.; FELDMANN; P.; RAO; S.; BERDING; N.; GLASZMANN; J. C. Characterisation of the double structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics**. v. 250; p. 405–413; 1996.

D'HONT; A.; ISON; D.; ALIX; K.; ROUX; C.; GLASZMANN J. C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**. v. 41; p. 221–225; 1998.

D'HONT; A.; SOUZA; G. M.; MENOSSE; M.; VINCENTZ; M.; VAN-SLUYS; M. A.; GLASZMANN; J. C.; ULIAN; E. Sugarcane: a major source of sweetness; alcohol; and bio-energy. In: Moore; P. H.; Ming; R. (eds). **Plant genetics and genomics: crops and models**. Springer New York; v.1; p. 483–513; 2008.

DELAUNEY; A. J.; VERMA; D.P.S. A soybean delta¹-pyrroline-5-carboxylate reductase gene was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. **Molecular and General Genetics**. v. 221; p. 299-350; 1990.

DEMIRAL; T.; TURKAN; I. Comparative lipid peroxidation; antioxidant defense systems and proline content in root of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**. v. 53; p. 247-257; 2005.

DIETZ K. J. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 15 (4); p.1129-1159; 2011.

DOURADO, M. N., MARTINS, P. F., QUECINE, M. C., PIOTTO, F. A., SOUZA, L. A., FRANCO, M. R., TEZOTTO, T., AZEVEDO, R. A. *Burkholderia* sp. SCMS54 reduces cadmium toxicity and promotes growth in tomato. **Annual Applied Biology**. v.163, p. 494-507, 2013.

DU; Y-C.; NOSE; A.; WASANO; K.; UCHIDA; Y. Responses to water stress of enzyme activities and metabolite levels in relation to sucrose and starch synthesis; the Calvin cycle and the C₄ pathway in sugarcane (*Saccharum* sp.) leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**. v. 25; p. 253–260; 1998.

EDREVA; A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. v. 106; p. 119–133; 2005.

- ENRIQUEZ-OBREGON, G. A. *et al.* Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**, v. 206, n. 1, p. 20-27, 1998.
- FALCO; M. C.; NETO; A. T.; ULIAN; E. C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Report**. v. 19; p. 1188–1194; 2000.
- FALCO; M. C.; SILVA-FILHO; M. C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 41; p. 761-766; 2003.
- FOYER; C. H.; NOCTOR; G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant Cell Environment** v. 28; p. 1056–71; 2005.
- FOYER; C.H.; BLOOM; A.J.; QUEVAL; G.; NOCTOR; G. Photorespiratory metabolism: genes; mutants; energetics; and redox signaling. **Annual Review of Plant Biology**. v. 60; p. 455–484; 2009.
- FOYER; C.H.; NOCTOR G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling; acclimation; and practical implications. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 11; p. 861–905; 2009.
- FRANÇOIS; L. E. Salinity effects on four sunflower hybrids. **Agronomy Journal**. v: 88; p. 215-219; 1996.
- FRICKE; W.; AKHIYAROVA; G.; VESELOV; D.; KUDOYAROVA; G. Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate response to salinity in barley leaves. **Journal Experimental Botany**. v. 55; p.1115–23; 2004.
- FRICKE; W.; PETERS; W. S. The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. **Plant Physiology**. v.129; p. 374–88; 2002.
- GARNCZARSKA; M.; BEDNARSKI; W.; MORKUNAS; I. Re-aeration-induced oxidative stress and antioxidative defenses in hypoxically pretreated lupines roots. **Journal Plant Physiology**. v. 161; p. 415-422; 2004.
- GASCHO; G. J.; SHIH; S. F. SUGARCANE. In: Teare; I.D.; Peet; M.M. (Ed.). **Crop-Water relations**. New York: John Wiley; p.445-479; 1983.

GILBERT, R. A. *et al.* Agronomic evaluation of sugarcane lines transformed for resistance to Sugarcane mosaic virus strain E. **Crop Science**. v. 45, n. 5, p. 2060-2067, 2005.

GILBERT, R. A. *et al.* Agronomic performance and genetic characterization of sugarcane transformed for resistance to sugarcane yellow leaf virus. **Field Crops Research**, v. 111, n. 1, p. 39-46, 2009.

GOFF; S. A.; RICK; D.; LAN; T. H.; PRESTING; G.; WANG; R.; DUNN; M.; GLAZEBROOK; J.; SESSIONS; A.; OELLER; P.; VARMA; H.; HADLEY; D.; HUTCHISON; D. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). **Science**. v. 296; p. 92–100; 2002.

GOLDEMBERG; J.; COELHO; S.T.; GUARDABASSI; P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**. v. 36; p. 2086-2097; 2008.

GRIVET; L.; ARRUDA; P. Sugarcane genomes: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 5; p. 122–127; 2001.

GROENEWALD, J. H.; BOTHA, F. C. Down-regulation of pyrophosphate: fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP) activity in sugarcane enhances sucrose accumulation in immature internodes. **Transgenic Research**. v. 17, n. 1, p. 85-92, 2008.

GRUSHKIN; D. Broken the mold. **National Biotechnol.** v. 29; p.16–18; 2011.

GUERZONI J. T. S.; BELINTANI N. G.; MOREIRA R. P.; HOSHINO A. A.; DOMINGUES D. S.; BESPALHOK – FILHO; J. C.; VIEIRA L. G. E. Stress-induced Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) gene confers tolerance to salt stress in transgenic sugarcane. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 36 (9); p. 2309-2319; 2014.

GUIMARÃES; E. R.; MUTTON; M. A.; MUTTON; M. J. R.; FERRO; M. I. T.; RAVANELI; G. C.; SILVA; J. A. Free proline accumulation in sugarcane under water restriction and spittlebug infestation. **Science Agriculture**. v. 65;p. 628–633; 2008.

HA; S.; MOORE; P.; HEINZ; D.; KATO; S.; OHMIDO; N.; FUKUI; K. Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor fluorescence in situ hybridization and image methods. **Plant Molecular Biology**. v. 39; p. 1165–1173; 1999.

HALL; A. J.; VILELLA; F.; TRAPANI; N.; CHIMENTI; C. The effects of water stress and genotype on the dynamics of pollen-shedding and silking in maize. **Field Crops Research**. v. 5; p.349–363; 1982.

HARE; P. D.; CRESS; W. A.; VAN STADEN; J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant; Cell and Environment**; n. 21; p.535- 553; 1998.

HASEGAWA; P. M.; BRESSAN; R. A.; ZHU; J. K.; BOHNERT; H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Plant Molecular Biology**. v.51; p.463-499; 2000.

HEMAPRABHA, G.; NAGARAJAN, R.; ALARMELU, S. Evaluation of drought tolerance potential of elite genotypes and progenies of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids). **Sugar Tech** v. 15, p. 9–16, 2013.

HOHMANN; S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 66; p. 300–372; 2002.

HONG; S.W.; JON; J.H.; KWAK; J.M.; NAM; H. G. Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid; dehydration; high salt; and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**. v. 113; p. 1203-12. 1997.

HONG; Z.; LAKKINENI; K.; ZHANG; Z.; VERMA; D. P. S. Removal of feedback inhibition of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**. v. 122; p. 1129–1136; 2000.

HOQUE; M. A.; OKUMA; E.; BANU; M. N. A.; NAKAMURA; Y.; SHIMOISHI; Y.; MURATA; Y. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. **Journal of Plant Physiology**. v. 164; p. 553-561; 2007.

HOTTA; C. T.; LEMBKE; C. G.; DOMINGUES; D. S.; OCHOA; E. A.; GUILHERME M. Q. CRUZ; G. M. Q.; MELOTTO-PASSARIN D. M.; MARCONI T. G.; SANTOS M. O.; MOLLINARI M.; MARGARIDO G. R. A.; CRIVELLARI A. C.; D. DOS SANTOS W. D.; DE SOUZA A. P.; HOSHINO A. A.; CARRER H.; SOUZA A. P.; GARCIA A. A. F.; BUCKERIDGE M. S.; MENOSSI M.; SLUYS M-ANNE V.; SOUZA G. M. The

biotechnology roadmap for sugarcane improvement. **Tropical Plant Biology**. v. 3; n: 2; p. 75-87; 2010.

HSIAO; T. C. Plant response to water stress. **Plant Physiology**. n. 24; p.519-570; 1973.

HUA Z. M.; YANG, X.; FROMM, M. E. Activation of the NaCl- and drought-induced RD29A and RD29B promoters by constitutively active Arabidopsis MAPKK or MAPK proteins. **Plant, Cell & Environment** .v. 29, p. 1761–1770, 2006.

IMPA, S. M. S., NADARADJAN, S., JAGADISH, S. V. K. Drought stress induced reactive oxygen species and anti-oxidants in plants. In: Ahmad, P., Prasad, M.N.V. (Eds.), *Abiotic Stress Responses in Plants*. Springer, New York, p. 131- 147, 2012.

INGELBRECHT, I. L.; IRVINE, J. E.; MIRKOV, T. E. Posttranscription gene silencing in transgenic sugarcane: dissection of homology-dependent virus resistance in monocot that has a complex polyploidy genome. **Plant Physiology**, v. 119, n. 4, p. 1187-1197, 1999.

INMAM-BAMBER; N. G.; BONNET; G. D.; SPILLMAN; M. F.; HEWITT M. L.; JACKSON; J. Increasing sucrose accumulation in sugarcane by manipulating leaf extension and photosynthesis with irrigation. **Australian Journal of Agricultural Research**. v. 59; p. 13–26; 2008.

INZÉ; D.; VAN MONTAGU; M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 6; p. 153–158. 1995.

JANGPROMMA N, SONGSRI P, THAMMASIRIRAK S, JAISIL P. Rapid assessment of chlorophyll content in sugarcane using a spad chlorophyll meter across different water stress conditions. **Asian Journal Plant Scice**. v. 9, p.368–374, 2010.

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**. v. 53; p. 2401–2410; 2002.

JORDAN; W. R.; DUGAS; W. A.; SHOUSE; P. J. Strategies for crop improvement for drought-prone regions. **Agricultural Water Management**. v. 7; p. 281–289; 1983.

JORNALCANA; 2014. <<http://www.jornalcana.com.br/avanca-a-colheita-de-cana-no-parana-mas-seca-provocara-quebra>>. Acesso 30 nov. 2014.

KAR, R. K. Plant responses to water stress. Role of reactive oxygen species. **Plant Signaling & Behavior**. v. 6, p. 1741-1745, 2011.

KARIM; S.; ARONSSON; H.; ERICSON; H.; PIRHONEN; M.; LEYMAN; B.; WELIN; B.; MÄNTYLÄ; E.; PALVA; E.T.; VAN DIJCK; P.; HOLMSTRÖM; K.O. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. **Plant Molecular Biology**. v. 64; p. 371–386; 2007.

KHEDR; A. H. A; ABBAS; M. A.; WAHID; A. A. A.; QUICK; W. P. ; ABOGADALLAH; G. M. Proline induces the expression of salt-stress responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L.; to salt-stress. **Journal of Experimental Botany**. v. 54; p. 2553-62; 2003.

KIYOSUE; T.; YOSHIBA; Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; K.; SHINOZAKI; K. A nuclear gene; encoding mitochondrial proline dehydrogenase; an enzyme involved in proline metabolism; is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. v. 8; p. 1323-1335; 1996.

KOVTUN; Y.; CHIU W.-L.; TENA; G.; SHEEN; J. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. n.97; p. 2940-2945; 2000.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal Experimental Botany**. v. 63, p.1593–1608, 2012.

KWAK J M. MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v. 106, p.20520–20525, 2009.

LALIBERTE; G.; HELLEBUST; A. J. Pyrroline-5-Carboxylate Reductase in *Chlorella autotrophica* and *Chlorella saccharophila* in Relation to Osmoregulation. **Plant Physiology**: p. 91; 917-923; 1989.

LAWLOR D.W., TEZARA W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals Botany**. v.103, p. 561-579, 2009.

LEVITT; J. Responses of plants to environmental stresses. New York: Academic Press. 1972.

LIU; Q.; KASUGA; M.; SAKUMA; Y.; ABE; H.; MIURA; S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; K.; SHINOZAKI; K. Two transcription factors; DREB1 and DREB2; with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression; respectively; in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. v. 10; p. 1391–1406; 1998.

LOGAN; B. A. Reactive oxygen species and photosynthesis. **In: Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants**; ed. N Smirnoff. Oxford: Blackwell. p. 250 – 67; 2005.

LOPES M. S.; ARAUS J. L.; VAN HEERDEN P. D. R.; FOYER C. H. Enhancing drought tolerance in C4 crops. **Journal of Experimental Botany**. v. 62; n. 9; p. 3135–3153; 2011.

LOPES; M. S.; REYNOLDS; M. P. Partitioning of assimilates to deeper roots is associated with cooler canopies and increased yield under drought in wheat. **Functional Plant Biology**. v. 37; p. 147–156; 2010.

MAAS; E. V.; HOFFMAN; G. J. Crop Salt Tolerance. **Tese**. U.S. Department of agriculture. Riverside California; 1968.

MAAS; E. V.; POSS J; A.; HOFFMAN; G. J. Salinity Sensitivity of Sorghum at Three Growth Stages. **Irrigation Science**. v. 7; p. 1-11; 1986.

MAAS; E. V.; RHOADES. Agricultural Salinity Assessment and Management. **American Society of Civil Engineers**: 262 - 304; 1990.

MACCHERONI; W.; JORDÃO; H.; DE GASPARI; R.; MOURA; G.L.; MATSUOKA; L. Development of a dependable microsatellite-based. **Sugarcane International**. v. 27; n: 2; p. 8-13; 2009.

MACHADO R.S., RIBEIRO R.V., MARCHIORI P.E.R. *et al*. Biometric and physiological responses to water deficit in sugarcane at different phenological stages. **Pesquisa agropecuária brasileira**. V. 44, p. 1575–1582, 2009.

MAEDA; T.; WURGLER-MURPHY; S.M.; SAITO; H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. **Nature**. n. 369; p.242-245; 1994.

MAGGIO; A.; MIYAZAKI; S.; VERONESE; P.; FUJITA; T.; IBEAS; J. I.; DASM B.; NARASIMHAN M. L.; HASEGAWA P. M.; JOLY R. J.; BRESSAN R. A. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **Plant Journal**; n.31; p. 699-703; 2002.

MAHAJAN; S.; TUTEJA; N. Cold; salinity and drought stresses: An overview. **Archives in Biochemistry and Biophysics**. v. 23; p. 57-67; 2005.

MAJEE; M.; MAITRA; S.; DASTIDAR; K. G.; PATTHAIK; S.; CHATTERJEE; A.; HAIT; N. C.; DAS; K. P.; AN MAJUMDER; A. L. A novel salt-tolerant L-myo-inositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka; a halophytic wild rice; molecular cloning; bacterial overexpression; characterization; and functional introgression into tobacco conferring salt tolerance phenotype. **Journal of Biological Chemistry**. v. 279; p. 28539–28552; 2002.

MANICKAVASAGAM, M. *et al.* *Agrobacterium* mediated genetic transformation and development of herbicid resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Reports**. v. 23, n. 1, p. 134-243, 2004.

MATYSIK; J.; ALIA BHALUB; B.; MOHANTY; P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science**; n.82; p.525-532; 2002.

MCKERSIE B. D. Chilling Stress. Department of Crop Science; University of Guelph. [www.agronomy.psu.edu/Courses/AGRO 518/CHILLING.htm](http://www.agronomy.psu.edu/Courses/AGRO%20518/CHILLING.htm). December 1996.

MCQUALTER, R. B. *et al.* Production and evaluation of transgenic sugarcane containing a Fiji disease virus (FDV) geneom segment S9-derived synthetic resistance gene. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, n. 1, p. 139-145, 2004.

MELONI; D. A.; OLIVA; M. A.; MARTINEZ; C. A.; CAMBRAIA J. Photosynthesis and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environ Experience Botany** v. 49; p. 69 – 76; 2003.

MILLER; G.; SUZUKI; N.; CIFTCI-YILMAZ; S.; MITTLER; R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant Cell & Environment**. v. 33; p. 453–467; 2010.

MING; R.; SIN-CHIEH; L.; MOORE; P.H.; IRVINE; J.E.; PATERSON; A.H. QTL analysis in a complex autopolyploid: Genetic control of sugar content in sugarcane. **Genome Research**. v. 11; p. 2075-2084; 2001.

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

MIZOGUCHI; T.; IRIE; K.; HIRAYAMA; T.; HAYASHIDA; N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; K.; MATSUMOTO; K.; SHINOZAKI; K. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch; cold; and water stress in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 93; p. 765-769; 1996.

MOLINARI; H.B.C.; MARUR; C.J.; DAROS; E.; CAMPOS; M.K.F.; CARVALHO; J.F.R.P.; 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. 218-225; 2007.

MOLLER; I. M.; JENSEN; P. E.; HANSSON; A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**. v. 58; p. 459–481; 2007.

MOLLER; I. M.; SWEETLOVE; L. J. ROS signalling – specificity is required. **Trends in Plant Science**. v. 15; p. 370–374; 2010.

MOORE; P. H. MING; R. Sugarcane Breeding and Biotechnology to Feed the Emergent Sugarcane Biorefinery Industry. **Tropical Plant Biology**; v.4; p.1-2; 2011.

MOUSTAFA K.; LEFEBVRE-DE VOS D.; LEPRINCE A-S.; SAVOURE'E A.; LAURIE`RE C. Analysis of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinase families: organ specificity and transcriptional regulation upon water stresses. **Scholarly Research Exchange**. p 12, v. 2008, 2008.

MOUSTAFA, K.; ABU QAMAR, S.; JARRAR, M.; AL-RAJAB, A. J.; Tremouillaux-Guiller J. MAPK cascades and major abiotic stress. **Plant Cell Report**. v. 33, p.1217–1225, 2014.

MUELLER; M. J.; BERGER; S. Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. **Phytochemistry**. v.70; p. 1511– 1521; 2009.

MUNNS; R.; TESTER; M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**. v. 59; p. 651-681; 2008.

NAIDU; B. P. Production of betaine from Australian *Melaleuca spp.* for use in agriculture to reduce plant stress. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. v. 43; p. 1163-1170; 2003.

NING, J.; LI, X.; HICKS, L. M.; XIONG, L. Raf-like MAPKKK gene DSM1 mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. **Plant Physiology**. v. 152, p. 876–890, 2010.

NOCTOR G.; DE PAEPE; R.; FOYER; C.H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**. v. 12; p. 125–134; 2007.

OLIVER M. J.; DOWD S. E.; ZARAGOZA J.; MAUGET S. A.; PAYTON P. R. The rehydration transcriptome of the desiccation-tolerant bryophyte *Tortula ruralis*: transcript classification and analysis. **BMC Genomics**. v. 5; p. 75-89; 2004.

OMETO; J. C. Parâmetros meteorológicos e a cultura da cana-de-açúcar. Piracicaba: ESALQ; p.17; 1980.

PASTORI; G. M.; FOYER; C. H. Common components; networks; and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of ‘redox’ and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**. v. 129; p. 460–468; 2002.

PINHEIRO; C.; CHAVES; M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**. v. 62; p. 869–882; 2011.

PONNAMPERUMA; F. N. Physicochemical properties of submerged soils in relation to fertility. **Los Baños: IRRI Research Paper Serie**. v.5; p. 32; 1977.

PRABU; G.; KAWAR; P. G.; PAGARIYA; M. C.; PRASAD; D. T. Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**. v. 29; p. 291–304; 2011.

PROCHAZKOVA; D.; SAIRAM; R. K.; SRIVASTAVA; G. C.; SINGH; D. V. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. **Plant Science**. v. 161; p. 765-771; 2001.

RAI; M.; HE; C.; WU; R. Comparative functional analysis of three abiotic stress inducible promoters in transgenic rice. **Transgenic Research**. v. 18; p. 787–799; 2009.

RAMANJULU; S; BARTELS; D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant Cell Environ**. v. 25 (2); p.141-151; 2002.

RHODES; D.; HANSON; A. D. Quarternary ammonium and tertiary sulphonium compounds of higher plants. **Plant Molecular Biology**. v. 44. P. 357-384; 1993.

RIBEIRO, R. V., MACHADO, R. S., MACHADO, E. C., MACHADO, D. F. S. P., MAGALHÃES FILHO, J. R., LANDELL, M. G. A. Revealing drought-resistance and productive patterns in sugarcane genotypes by evaluating both physiological responses and stalk yield. **Experience Agriculture** v. 49, p.212-224, 2013.

RICHARDS; R. A. Defining selection criteria to improve yield under drought. **Plant Growth Regulation**. v. 20; p. 157–166; 1996.

RIERA; M.; VALON; C.; FENZ; I. F.; GIRAUDA T; J.; LEUNG; J. The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signalling components. **Physiology Plant**. v. 123; p.111–119; 2005.

RIPLEY; B. S.; GILBERT; M. E.; IBRAHIM; D. G.; OSBORNE; C. P. Drought constraints on C4 photosynthesis: stomatal and metabolic limitations in C3 and C4 subspecies of *Alloteropsis semialata*. **Journal of Experimental Botany**. v. 58; p. 1351–1363; 2007.

RIPLEY; B.; FROLE; K.; GILBERT; M. Differences in drought sensitivities and photosynthetic limitations between co-occurring C3 and C4 (NADP-ME) *Panicoid* grasses. **Annals of Botany**. v. 105; p. 493–503; 2010.

ROBERTSON; M. J.; INMAM-BAMBER; N. G.; MUCHOW; R. C.; WOOD; A. W. Physiology and productivity of sugarcane with early and midseason water deficit. **Field Crops Research**. v. 64; p. 211–227; 1999.

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

RONTEIN; D.; BASSET; G.; HANSON; A. D. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. **Metabolic Engineering**. v.4; p. 49–56; 2002.

ROOSENS; N. H.; BITAR; F. A. L.; LOENDERS; K.; ANGENON; G.; JACOBS; M. Overexpression of ornithione- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. **Molecular Breeding**. v. 9; p. 73-80; 2002.

ROZEFF; N. Sugarcane and Salinity – a review paper. **Sugarcane**; n.5; p.8-19; 1995.

SAIRAM; R. K.; RAO; K. V.; SRIVASTAVA; G. C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress; antioxidant activity and osmolytes concentration. **Plant Science**. v.163; p.1037–1046; 2002.

SATO; A. M.; CATUCHI; T. A.; RIBEIRO; R. V.; SOUZA; G. M. The use of network analysis to uncover homeostatic responses of a drought tolerant sugarcane cultivar under severe water deficit and phosphorus supply. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 32; p. 1145–1151; 2010.

SCANDALIOS; J. G. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 38; p. 995 1014; 2005.

SCHAFFNER; A. R.; SHEEN; J. Maize rbcS promoter activity depends on sequence elements not found in dicot rbcS promoters. **Plant Cell**. v. 3; p. 997-1012; 1991.

SCHAFFNER; A. R.; SHEEN; J. Maize C4 photosynthesis involves differential regulation of maize PEPC genes. **Plant Journal**. v. 2; p. 221-232; 1992.

SEGATO; S. V. [ORG.]; MATTIUZ; C. F. M.; MOZAMBANI; A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. Atualização em Produção de Cana-de-Açúcar. Piracicaba – SP 2006.

SEKI; M.; KAMEI; A.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; K.; SHINOZAKI; K. Molecular responses to drought; salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Current Opinion Biotechnology**. v.14; p.194-199; 2003.

SETAMOU, M. *et al.* Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae): effects on life history parameters. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 2, p. 469-477, 2002.

SHARMA P; J. H. A. A. B; DUBEY R. S; PESSARAKLI M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal Botanic**. doi:10.1155/2012/217037

SHEEN; J. Metabolic repression of transcription in higher plants. **Plant Cell**. v. 2; p. 1027-1038; 1990.

SHEEN; J. Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize pyruvate; orthophosphate dikinase genes. **Plant Cell**. v. 3; p. 225-245; 1991.

SHEEN; J. Protein phosphatase activity is required for lightinducible gene expression in maize. **The EMBO Journal**. v.12; n. 9; p. 3497-3505; 1993.

SHEN; Q.; CHEN; C-N.; BRANDS; A.; PAN; S-M.; HO; D. T-H. The stress-and abscisic acid-induced barley gene HVA22: developmental regulation and homologues in diverse organisms. **Plant Molecular Biology**. v. 45; p. 327-340; 2001.

SHEN; Q.; HO; T. H. D. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent response complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. **Plant Cell**. v. 7; p. 295-307; 1995.

SHI J.; ZHANG L.; AN H.; WU C.; GUO X. GhMPK16, a novel stress-responsive group D MAPK gene from cotton, is involved in disease resistance and drought sensitivity. **BMC Molecular Biology** v. 12, p. 22, 2011.

SHINOZAKI; K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold; drought; and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA get-blot analyses. **Plant Physiology**. v.133; p. 1755-17; 2003.

SHOU, H., FRAME, B., WHITHAM, S., WANG, K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or Agrobacterium-mediated transformation. **Molecular Breeding**, v.13, p.201-208, 2004c

SHOU, H.; BORDALLO, P.; FAN, J-B.; YEAKLEY, J. M.; BIBIKOVA M.; SHEEN J.; WANG K. From The Cover: Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize. **PNAS**. v.101, p. 3298-3303, 2004b.

SHOU, H.; BORDALLO, P.; WANG, K. J. Expression of the *Nicotiana* protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. **Journal of Experimental Botany**. v. 55, p. 1013-1019, 2004a.

SILVA, M. A; JOHN, J. L; DA SILVA, J. A. G; SANTOS, C.; SHARMA M. Relationships between physiological traits and productivity of sugarcane in response to water deficit. **Jounal Agriculture Science**. v.152, p.104–118, 2014.

SKIVER; K.; MUNDY; J. Gene expression in response to abscisic and osmotic stress. **Plant Cell**. v. 2; p. 503-512; 1990.

SMART, R. E.; BINGHAM, G. E. Rapid Estimates of Relative Water Content. **Plant Physiology**. v. 53; p. 258-260; 1974.

SODERMAN, E.; MATTSSON, J.; ENGSTRÖM, P. The *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-7* is induced by water deficit and by abscisic acid. **Plant Journal**. v. 10; p. 375–381; 1996.

SPONCHIADO, B. N.; WHITE, J. W.; CASTILLO, J. A.; JONES; P. G. Root growth of four common bean cultivars in relation to drought tolerance in environments with contrasting soil types. **Experimental Agriculture**. v. 25; p. 249–257; 1989.

SRIVASTAVA, J. P.; JANA; S. Screening wheat and barley germplasm for salt tolerance. In. **Salinity Tolerance in Plants**. Eds. R C Staples and G H Toenniessen. p. 273-283. John Wiley and Sons; New York; 1984.

STEWARD, C. R.; LEE, J. A. The rate of proline accumulation in halophytes. **Plant**. v. 120; p. 279-289; 1974.

SU, J.; SHEN, Q.; HO, T-H.D.; WU, R. Dehydration-stress-regulated transgene expression in stably transformed rice plants. **Plant Physiology**. v. 117; p. 913- 922;1998.

SU, J.; WU, R. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. **Plant Science**. v. 166; p. 941–948; 2004.

SURI, S. S, DHINDSA, R. S. A heat-activated MAP kinase (HAMK) as a mediator of heat shock response in tobacco cells. **Plant Cell Environ** v.31, p.218–226, 2008.

TAIZ; L.; ZEIGER; E. **Fisiologia Vegetal**. 7^o ed.; Porto Alegre: Artmed; 2009.

TAKAHASHI; S.; MURATA; N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? **Trends in Plant Science**. v. 13; p. 178–182; 2008.

TARDIEU; F.; BRUCKLER; L.; LAFOLIE; F. Root clumping may affect the root water potential and the resistance to soil–root water transport. **Plant and Soil**. v. 140; p. 291–301; 1992.

TRUJILLO; L. E.; SOTOLONGO; M.; MENÉNDEZ; C.; OCHOGAVÍA; M. E.; COLL; Y.; HERNÁNDEZ; I.; BORRÁS-HIDALGO; O.; THOMMA; B. P. H. J.; VERA; P.; HERNÁNDEZ; L. SodERF3; a novel sugarcane ethylene responsive factor (ERF); enhances salt and drought tolerance when overexpressed in tobacco plants. **Plant Cell Physiology**. v. 49; p. 512–525; 2008.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. 2014. Historico-de-producao-e-moagem. <www.unica.com.br>. Acesso em: nov. 2015.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. 2014. UNICA espera mudanças em relação à política energética do governo e interlocução direta com a presidenta Dilma. <www.unica.com.br>. Acesso em: nov. 2015.

URAO, T.; YAKUBOV, B.; SATOH, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M.; HIRAYAMA; T.; SHINOZAKI; K. A trans-membrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. **Plant Cell**; v. 11; p.1743 -175; 1999.

VAN, CAMP W.; CAPIAU, K.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; SLOOTEN, L. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. **Plant Physiology**. v.112; p. 1703–1714; 1996.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**. v. 35; p. 753-759; 2008.

VICKERS, J. E. *et al.* Effects of tissue culture, biolistic transformation, and introduction of PPO and SPS gene constructs on performance of sugarcane clones in the field. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 1, p. 57-68, 2005.

VRANOVA, E.; TAHTIHARJU, S.; SRIPRANG, R.; WILLEKENS, H.; HEINO, P.; PALVA, E.T.; INZE, D.; VAN CAMP, W. The AKT3 potassium channel protein interacts with the AtPP2CA protein phosphatase 2C. **Journal Experimental Botany**. v. 52; p.181-2. 2001.

WACLAWOVSKY, A. J; SATO, P. M.; LEMBKE, C. G.; MOORE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotech Journal**. v. 8; p.1–14; 2010.

WADITEE, R.; HIBINO, T.; NAKAMURA, T.; INCHAROENSAKDI, A.; TAKABE, T. Overexpression of a Na⁺/H⁺ antiporter confers salt tolerance on a freshwater cyanobacterium; making it capable of growth in sea water. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**. v. 99; p. 4109–4114; 2002.

WALTZ, E. Shell's billions to convert Brazilian biomass into fuel. **National Biotechnol.** v. 28; p. 305–305; 2010.

WARD, J. M.; HIRSCHI, K. D.; SZE, H. Plants pass the salt. **Trends Plant Science**. v. 8; p. 200–201; 2003.

WENG L. X.; DENG H. H.; XU J. L.; LI Q.; ZHANG Y. Q.; JIANG Z. D.; LI Q. W.; CHEN J. W.; ZHANG L. H. Transgenic sugarcane plants expressing high levels of modified *cryIac* provide effective control against stem borers in field trials. **Transgenic Research**, 20, 759-772, 2011.

WESTGATE, M. E.; BOYER, J. S. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf; root; stem and silk growth at low water potentials in maize. **Planta**. v. 164; p. 540–549; 1985.

WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. Drought; ozone; ABA and ethylene: new insights from cell to plant community. **Plant Cell Environ**. v. 33; p. 510–525; 2010.

WU, L. & BIRCH, R. G. Doubled sugar content in sugarcane plant modified to produce a sucrose isomer. **Plant Biotechnology Journal**. v. 5, p.109-117, 2007.

XIONG, L.; YANG, Y. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. **Plant Cell**. v. 15, p. 745–759, 2003

XIONG, L.; ZHU, J.-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell Environ**. v.25; p.131-139; 2002.

XU, J.; CHUA, N. H. Dehydration stress activates Arabidopsis MPK6 to signal DCP1 phosphorylation. **EMBO Journal**. v.31, p.1975–1984, 2012.

YANG, C. M.; FAN, M. J.; HSIANG, W. M. Growth and yield responses of maize (*Zea mays* L.) to soil water deficits. II. Effects of water deficit timing and strength. **Journal of Agricultural Research China**. v. 42; p. 173–186; 1993.

YOSHIBA; Y.; KIYOSUE; T.; KATAGIRI; T.; UEDA; H.; MIZOGUCHI; T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; WADA K.; HARADA; Y.; SHINOZAKI K. Correlation between the induction of a gene for delta1-pyrroline -5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. **Plant**. v. 7; p. 751-760; 1995.

YU, J.; HU, S.; WANG, J.; WONG, G. K.; LI, S.; LIU, B.; DENG, Y.; DAI, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; CAO, M.; LIU, J. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). **Science**. v. 296; p. 79–92; 2002.

YU, Q.; RENGEL, Z. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupins. **Plant Science**. v. 142; p. 1-11; 1999.

YUPSANIS, T.; KEFALAS, P. S.; ELEFThERIOU, P.; KOTINIS, K. RNase and DNase activities in the alfalfa and lentil grown in iso-osmotic solutions of NaCl and mannitol. **Plant Physiology**. v. 158; p. 921-927; 2001.

ZHANG L.; XI D.; LI S.; GAO Z.; ZHAO S.; SHI J.; WU C.; GUO X. A cotton group C MAP kinase gene, GhMPK2, positively regulates salt and drought tolerance in tobacco. **Plant Molecular Biology**. v. 77, p. 17–31, 2011.

ZHANG, C. S.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase; a bifunctional enzyme catalysing the first two steps of proline biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry**. v. 270; p. 20491-20496; 1995.

ZHANG, I.; XU, J.; BIRCH, R. G. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. **Nature Biotechnology**. v. 17, n. 10, p. 1021-1024, 1999.

ZHANG, S. Z.; YANG, B. P.; FENG, C. L.; CHEN, R. K.; LUO, J. P.; CAI, W. W.; LIU, F. H. Expression of the *Grifola frondosa* trehalose synthase gene and improvement of drought-tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Journal Integrative Plant Biology**. v. 48; p. 453–459; 2006.

ZHU, J-K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**: v. 6; p. 66-71; 2001

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

ZHU, Y. J.; MCCAFFERTY, H.; OSTERMAN, G.; LIM S.; AGBAYANI, R.; LEHRER, A.; SCHENCK, S.; KOMOR, E. Genetic transformation with untranslatable coat protein gene of sugarcane yellow leaf virus reduces virus titers in sugarcane. **Transgenic Research**, v. 20, p. 503-512, 2011.

4. CAPÍTULO 1

DESEMPENHO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE CANA-DE- AÇÚCAR COM O GENE NPK1 DE TABACO SOB PRIVAÇÃO DE ÁGUA

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes do mundo. No entanto, a produtividade é afetada por estresses abióticos causando perdas indesejáveis. Sendo assim, a tolerância à seca é uma característica desejável em cana-de-açúcar nos estágios iniciais de desenvolvimento em condições sub-ótimas para garantir um melhor desempenho agrônômico. Estudos anteriores apontam que a expressão do gene *NPKI*, que pertence à família de genes MAPKKK, ativa uma cascata da via de sinalização do estresse oxidativo que conduz a tolerância a estresses abióticos em plantas de tabaco e milho. Com base nisso, o presente estudo teve como objetivo de avaliar a resposta ao estresse hídrico de plantas transgênicas de cana-de-açúcar com expressão constitutiva do gene *NPKI*. Dois eventos transgênicos foram analisados 0, 6, 9 e 12 dias após a privação de água. Plantas transgênicas apresentaram significativamente melhor taxa de fotossíntese, condutância estomática e potencial de água do que as plantas não-transgênicas sob déficit hídrico. Também, as plantas transgênicas apresentaram um melhor desempenho em relação à condutância estomática, transpiração e teor de prolina livre e menor dano às células. Assim, essas plantas apresentam potencial para suportar períodos sazonais de seca observadas nas principais regiões produtoras.

Palavras-chave: *Saccharum spp.*, estresse abiótico; proteína-quinase, MAPK.

ABSTRACT

HIGHER PERFORMANCE OF SUGARCANE NPK1 TRANSGENIC PLANTS UNDER WATER DEPRIVATION

Sugarcane is one of the most important crops worldwide. Nevertheless, productivity is affected by abiotic stresses causing undesirable losses. Thus, drought stress tolerance is a desirable feature to sugarcane in the initial stages of development, as well as to guarantee agronomic performance in suboptimal conditions. Previous studies pointed out that expression of gene *NPK1*, which belongs to MAPKKK gene family, activates an oxidative signal cascade that led to abiotic stresses tolerance in different plants. Based on that, this study aimed to evaluate the drought stress response of sugarcane transgenic plants with gene *NPK1* constitutive expression. Two transformation events were analyzed at 0, 6, 9 and 12 days after water deprivation. Transgenic plants exhibit significantly better photosynthesis rate, stomatal conductance and water potential than non-transgenic controls under water deficit. Higher performance of transgenic plants was observed regarding stomatal conductance, transpiration, and free proline content, and present lower less cell damage. Thus, these plants may have greater potential in situations commonly found during seasonal drought periods observed in the main producing regions.

Keywords: *Saccharum spp.*; abiotic stress; protein kinase, MAPK.

5.1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma planta nativa de áreas tropicais com via fotossintética C4, o que lhe confere alta produtividade. Sua distribuição geográfica estende-se pelos dois hemisférios, em 121 países (FAO; 2013), sendo os principais produtores o Brasil, Índia e a China (FAO, 2013). A produção brasileira na safra 2013/2014 foi de 653 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (UNICA, 2014). As principais regiões de cultivo no Brasil são o Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste. No estado do Paraná, a cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas, sendo cultivada principalmente na região Norte e Noroeste do estado.

A produção da cana-de-açúcar é influenciada por um grande número de fatores ambientais. Alguns desses não são passíveis de manejo, como clima, enquanto outros podem ser manejados para permitir o melhor desempenho da cultura. Os fatores abióticos, como seca, calor e salinidade, são os principais responsáveis pela distribuição geográfica e pela produtividade das culturas agrônomicas. Eles constituem também a principal causa de prejuízos econômicos na produção, sendo responsáveis por até 50% de perda em alguns casos (BRAY *et al.*, 2000; SUPRASANNA *et al.*, 2011).

O estresse hídrico é um dos fatores que mais influencia a produtividade da cana. A primeira resposta das plantas ao estresse hídrico é a redução no crescimento, existindo uma correlação direta com a redução do potencial de água e diminuição da fotossíntese (WILKINSON & DAVIES, 2010). Seu efeito na planta afeta principalmente as taxas de assimilação de CO₂, tamanho das células foliares, taxa de transpiração, potencial de água na planta, taxa de crescimento e abertura estomática (HSIAO, 1973). Além disso, o estresse hídrico influencia de maneira direta no crescimento dos perfilhos e na altura final dos colmos e, conseqüentemente, na produção de açúcar (GASCHO & SHIH, 1983).

Plantas de cana-de-açúcar necessitam de umidade disponível no solo durante o período de crescimento. Porém, durante a maturação, o ideal é que haja redução na água disponível, não drasticamente, mas o suficiente para reduzir o crescimento e induzir a maior concentração de açúcar nos colmos. A maioria das regiões canavieiras do país apresenta um volume adequado de chuvas para a cultura, o qual é estimado em 1500 mm anuais (OMETO, 1980). Entretanto, o mais importante é a distribuição pluviométrica, que é bastante irregular. De acordo com Cunha & Bergamaschi (1992), períodos com precipitação inferior a 50-60 mm são considerados períodos de déficit hídrico.

O melhoramento genético da cana encontra maiores desafios comparado com outras culturas economicamente importantes devido ao seu alto nível de poliploidia, heterose, aneuploidia, genoma complexo, e longos ciclos de propagação e seleção (GUPTA *et al.*, 2010). Os métodos tradicionais de hibridação da cana-de-açúcar têm obtido relativo sucesso no atendimento do setor produtivo (RICHARDS, 1996). Entretanto, ainda persistem fortes perdas de colheitas devido a influências bióticas e abióticas. Neste aspecto, a biotecnologia oferece alternativas para a redução do tempo de obtenção de novos genótipos, com a produção de plantas transgênicas, que abre novas perspectivas aos programas de melhoramento, permitindo a incorporação de características desejáveis às espécies cultivadas. Os avanços da genômica e da engenharia genética permitiram aos cientistas identificar, isolar e segurar transferência e integração de genes alvo que controlam características desejáveis em plantas de cana (BUTTERFIELD *et al.*, 2002).

Métodos de transformação por biobalística tem sido a tecnologia dominante para a geração de cana-de-açúcar transgênica (ALTPETER & ORABY, 2010). A transformação via biolística com DNA utilizando cassetes contendo promotor, gene de interesse, e terminador tem sido relatada em cana de açúcar (KIM *et al.*, 2012; JACKSON *et al.*, 2013; WALID *et al.*, 2015). No entanto a transformação mediada por *Agrobacterium* é mais desejável por gerar eventos de cópia única do transgene. Gramíneas não são hospedeiros naturais das *Agrobacterium*, porém já foram estabelecidas condições de transformação com várias espécies de plantas incluindo algumas das principais culturas de cereais (CHENG *et al.*, 2004, SHRAWAT & LORZ, 2006) e *Panicum virgatum* (LI & QU, 2011). Este método tem sido aplicado com sucesso a um número limitado de genótipos de cana-de-açúcar (JOYCE *et al.*, 2010). No entanto Wu *et al.* (2015) relata não haver diferenças significativas na eficiência de transformação, na frequência de integração de cópia única, ou no nível e na estabilidade da expressão do transgene entre os dois sistemas de transformação. Sugerindo que tanto *Agrobacterium* e biobalística fornecem protocolos adequados para geração de eventos de cana elite.

A resposta fisiológica para o estresse hídrico vem de mudanças na expressão gênica. Os produtos de genes induzidos pelo estresse podem ser classificados em dois grandes grupos: os que protegem a planta contra os estresses ambientais e os que regulam a expressão gênica e a transdução de sinais de resposta a estresses (SEKI *et al.*, 2003).

O primeiro grupo inclui proteínas que funcionam protegendo as células da desidratação, como as enzimas envolvidas na biossíntese de vários osmoprotetores, tais como

prolina, betaínas e polissacarídeos. No segundo grupo encontram-se os genes de diferentes módulos de percepção e transdução dos sinais de estresse, tais como receptores, sistemas de modificação de proteínas e reguladores de transcrição (XIONG & ZHU, 2002). Uma classe de proteínas importantes nesse processo é a classe das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), as quais podem formar uma cascata de fosforilação que amplifica as vias de transdução de sinais.

Algumas MAPKs estão envolvidas com a resposta à desidratação, em uma via dependente de ABA (KOVTON *et al.*, 2000). Essas MAPKs podem estar relacionadas com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que geram o estresse oxidativo. A transdução de sinais disparada por ROS pode induzir a expressão de genes de defesa, tais como proteínas de choque térmico (HSP), glutathione-S-transferase (GST), peroxidases, superóxido-dismutases e proteínas relacionadas à patogenicidade, protegendo a planta dos danos causados pelo estresse (KOVTON *et al.*, 2000). A expressão de MAPKs influenciam em várias atividades na célula, como a lignificação, ativação da via do ácido jasmônico, entre outras (INZÉ & VAN MONTAGU, 1995).

Especificamente em relação à quinase 1 de *Nicotiana* (*NP1*), este gene é encontrado naturalmente em plantas do tabaco, sendo que um gene homólogo ao gene *ANP1* de *Arabidopsis thaliana*. Este gene é ativado por mitogêno de proteína quinase quinase quinase (MAPKKK) que ativa uma cascata de sinalização oxidativa que leva à tolerância ao frio, calor e estresse salino em tabaco transgênico (KOVTON *et al.*, 2000). O domínio catalítico de *NP1* ativa um *BCK1* (bypass de quinase C) através da transdução de sinal em levedura, indicando que a função catalítica de *NP1* é conservada entre organismos diferentes (BANNO *et al.*, 1993). O gene *NP1* pode induzir a expressão de HSP e GST em *Arabidopsis* e milho e a ativação destes genes de estresse pode proteger a maquinaria fotossíntese das plantas a partir dos danos causadas pela seca, melhorando assim o potencial de rendimento das culturas. (KOVTON *et al.*, 2000). Para analisar a via de sinalização do estresse oxidativo em resposta a tolerância à seca um fragmento de MAPKKK de tabaco (*NP1*) foi expresso constitutivamente em milho (SHOU *et al.*, 2004). Neste estudo, o mesmo fragmento de cDNA foi expresso e codifica para o domínio da proteína quinase 1 de *Nicotiana* (*NP1*) em cana-de-açúcar sob o controle do promotor constitutivo.

A engenharia genética de plantas visando a tolerância à seca é baseada na manipulação de genes que protegem as células contra déficit hídrico melhorando o potencial de produção das plantas (VALLIYODAN *et al.* 2006). No trabalho de Muoma & Ombori (2014) a

transformação mediada por *Agrobacterium* em milho com o gene *NPK1* melhorou a tolerância à seca. Augustine *et al.* (2014) e Reis (2014) demonstraram que a superexpressão de DREB2, em cana-de-açúcar, melhorou a tolerância a seca. O mesmo foi observado em cana-de-açúcar superexpressando proteínas de choque térmico (EaHSP70) (AUGUSTINE *et al.*, 2015).

Assim, o objetivo deste estudo foi de transformar cana-de-açúcar com expressão constitutiva do gene *NPK1*. Os eventos transgênicos de cana obtidos por *Agrobacterium* e biobalística selecionados foram submetidos ao estresse hídrico e suas respostas bioquímicas e fisiológicas associadas à seca foram avaliadas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Vetor

O vetor utilizado para transformação genética de cana-de-açúcar foi o pSHX004 (SHOU *et al.*, 2004 a,b) contendo fragmento de cDNA codificando o domínio catalítico de 268 aminoácidos do gene *NPK1* de *Nicotiana tabacum*, sob controle de promotor modificado CaMV35S (35SC4PPDK) (SHEEN, 1993) e terminador *Tnos* (nopalina sintase) (DEPICKER *et al.*, 1982), e o gene marcador de seleção *bar*, que codifica para a enzima fosfinotricina acetil transferase, que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio (THOMPSON *et al.*, 1987), sob o controle do promotor constitutivo 2X CaMV35S (ODELL *et al.*, 1985), a região 5'UTR do gene *TEV* (tobacco etch vírus) (CARRINGTON & FREED, 1990) e o terminador *Tvsp* (proteína de armazenamento de soja) (MASON *et al.*, 1993). Este vetor foi gentilmente cedido pelo Dra. Kan Wang, da Universidade de Iowa, através de assinatura de MTA (Figura 2).



Fig. 2 Representação do T-DNA do vetor pSHX004 utilizado na transformação de cana. RB, borda direita; P35S**, promotor CaMV35S modificado (35SC4PPDK); fragmento do gene *NPK1*; *Tnos*, terminador nopalina sintase; P35S*, promotor 2X CaMV35S; *TEV*, região 5'UTR do tobacco etch vírus; *bar*, fosfinotricina acetiltransferase; *Tvsp*, terminador de proteína de armazenamento de soja; LB, Borda esquerda.

5.2.2 Transformação genética - Biobalística

Plantas de cana-de-açúcar cv. RB855536, com 6 a 8 meses de idade, foram utilizadas para a obtenção de calos embriogênicos. Folhas imaturas da região meristemática (cilindro de aproximadamente 2 x 10 cm) foram desinfestadas superficialmente por 1 min com etanol 70% (v/v), seguido de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 20 min e enxaguada em água destilada estéril. Em seguida, segmentos transversais com 2-3 mm foram colocados em

frascos contendo meio de indução MSC3 [sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), 20 g l⁻¹ de sacarose, 3 mg l⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 8 g l⁻¹ de bacto agar, pH 5,7] para a obtenção de calos embriogênicos a serem utilizados nos experimentos de transformação genética via biobalística (BOWER *et al.*, 1996). Mantidas no escuro por quatro semanas a 27±1 °C.

Calos embriogênicos foram individualizados em meio MSC3 e subcultivados por quatro dias antes do bombardeamento. Para transformação, calos embriogênicos (4-8 mm) transferidos em meio osmótico [sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), 20 g l⁻¹ de sacarose, 1 mg l⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 8 g l⁻¹ de bacto agar, pH 5,7 adicionado de 0,2 M de sorbitol e 0,2 M manitol] por 4 horas antes do bombardeamento de partículas (BOWER *et al.*, 1996). A suspensão de micropartículas foi preparada de acordo com metodologia de Sanford *et al.* (1993), usando 25 µl de suspensão de partículas (60 mg ml⁻¹), 2,5 µl do plasmídeo pSHX004 (0,5 mg µl⁻¹), 25 µl CaCl₂ (2,5 M) e 10 µl de espermidina (0,1 M). Cinco microlitros da suspensão de micropartículas foram pipetadas em membrana carreadora e secas em suporte contendo sílica gel em câmara de fluxo laminar. Partículas de tungstênio M-17 (Biorad, ~1,1 µM) foram usadas para os experimentos.

O equipamento de bombardeamento PDS-1000/He (Biorad) foi usado com pressão de vácuo de 27” Hg, 10 cm de distância do disco de ruptura e 10 mm da membrana carreadora. A pressão de ruptura de disco usada e distância da prateleira (distância percorrida pela micropartícula até atingir o explante) foram de 1200 psi e 90 mm, respectivamente.

Após o bombardeamento, os calos foram selecionados em meio de cultura MSC0 (MSC3 sem adição de 2,4-D, com 25 µM de glufosinato de amônio), a 27±1 °C sob fotoperíodo de 16 horas de luz. Decorrido o processo de seleção, os calos com 5-10 mm de diâmetro apresentando coloração esverdeada foram transferidos para meio de regeneração e enraizamento MSCR (MSC3 sem adição de 2,4-D e sem 25 µM de glufosinato de amônio) e mantidas sob luz. Plantas enraizadas *in vitro* foram transplantadas para casa de vegetação em substrato comercial (PlantmaxTM).

Foram consideradas como controle as plantas não transformadas que passaram por regeneração *in vitro* seguindo o mesmo protocolo de cultura de tecidos utilizados para transformação de cana-de-açúcar.

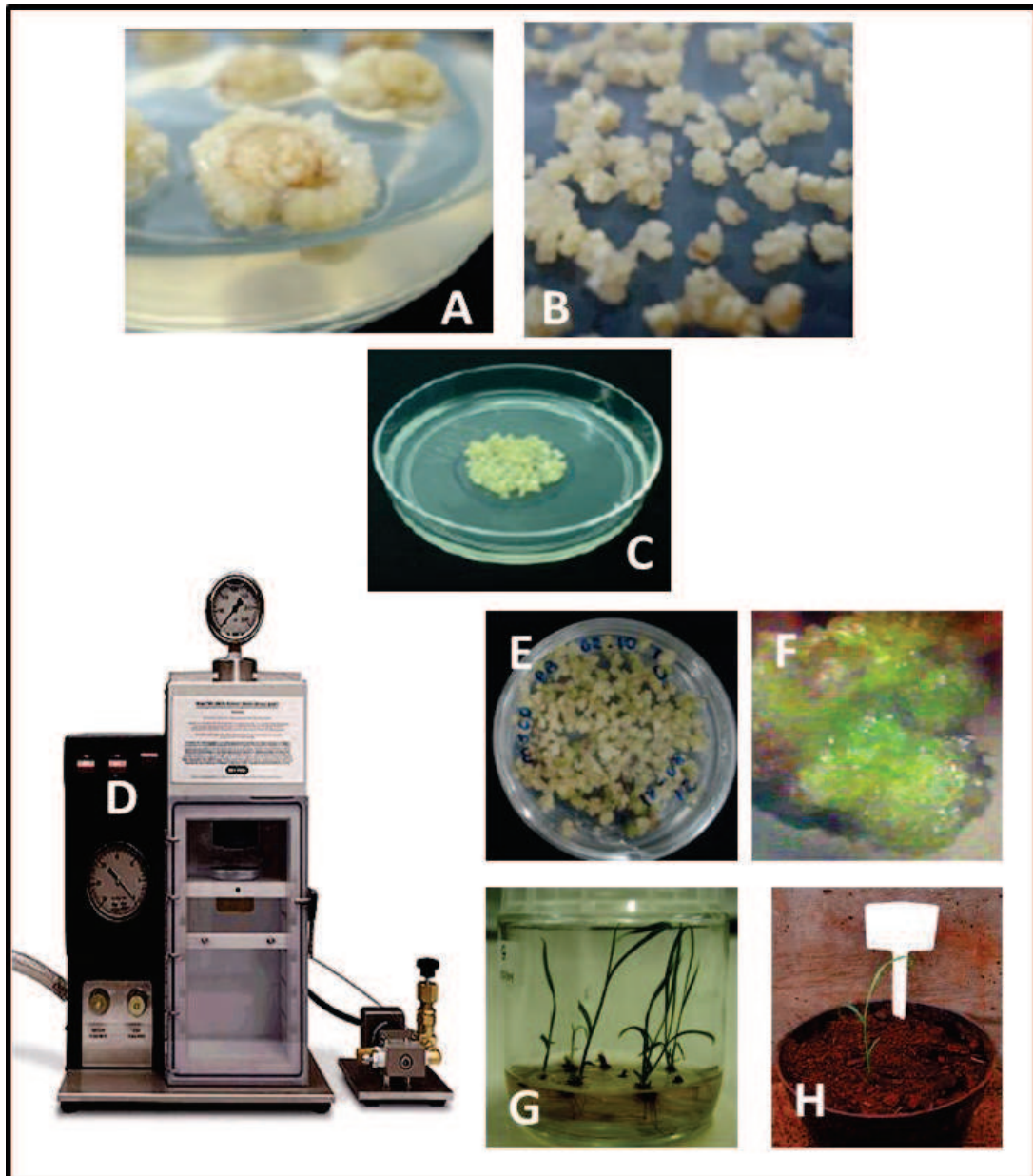


Fig. 3 Transformação genética de cana-de-açúcar por biobalística. **A** - Meristema apical de cana-de-açúcar com 2-3 mm em meio MSC3. **B** - Calos embriogênicos obtidos após 4 semanas de cultivo, multiplicados em meio MSC1. **C**- Calos embriogênicos em meio osmótico. **D** - Aparelho de bombardeamento. **E** – Regeneração dos calos embriogênicos em meio seletivo contendo glufosinato de amônio. **F** – Calo tolerante regenerando em meio seletivo. **G**- Regeneração de plantas transgênicas putativas. **H** – Aclimação das plantas em casa-de-vegetação.
Fonte: da autora

5.2.3 Transformação genética -via *Agrobacterium*

A obtenção de plântulas *in vitro* para transformação via *Agrobacterium* foi de acordo com o protocolo de micropropagação descrito por Tiel *et al.* (2006). Plântulas obtidas *in vitro* com 5-8 cm de altura foram utilizadas para transformação genética com a estirpe desarmada

EHA105 contendo o vetor binário pSHX004. As bactérias foram cultivadas em meio YMB (0,5 g l⁻¹ K₂HPO₄, 0,1 g l⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0,1 g l⁻¹ NaCl, 5 g l⁻¹ glicose, 10 g l⁻¹ de manitol and 0,4 g l⁻¹ extrato de levedura) suplementado com 20 mg l⁻¹ rifamicina e 100 mg l⁻¹ espectomicina a 27±1°C sob agitação de 150 rpm por 16 horas. A cultura foi centrifugada a 7.500 rpm por 10 min e, em seguida, ressuspensa em meio YMB com 200 mM acetoseringona. A densidade da cultura de bactérias foi ajustada para OD₆₀₀ = 0,2. Os caules de plântulas *in vitro* foram cortados transversalmente próximos à base (cilindro de aproximadamente 2-3 mm) e imersos na suspensão de bactéria por 5 min (MOLINARI *et al.*, 2004; ZHANGSUN *et al.*, 2007).

Para o co-cultivo os explantes foram colocados horizontalmente em placas de Petri contendo o meio MPI [sais MS, acrescido de 20 g l⁻¹ de sacarose, 4,5 µM l⁻¹ 2,4-D, 8 g l⁻¹ de bacto agar, pH 5,7, de acordo com o protocolo de micropropagação descrito por Tiel *et al.* (2006). Depois de três dias no escuro a 27±1°C, os explantes foram transferidos para o meio MPI suplementado com 200 mg l⁻¹ de timetina e 200 mg l⁻¹ de cefotoxina. Após sete dias, os explantes foram transferidos para meio MPII (MPI sem 2,4-D, suplementado com 0,5% de carvão ativado e 25 µM glufosinato de amônio) e incubados a 27±1°C sob fotoperíodo de 16 horas de luz. Após uma semana as culturas foram transferidas para novo meio de regeneração com as concentrações de sais do meio MPII suplementado com 2 mg l⁻¹ cinetina e 1,3 mg l⁻¹ ácido indol acético (AIA). Após a formação de brotos, estes foram transferidos para o meio de crescimento e enraizamento MSCR. Plantas enraizadas *in vitro* foram transplantadas em substrato comercial (PlantmaxTM) e mantidas em casa de vegetação para futuras análises moleculares e fisiológicas.

Foram consideradas como controle as plantas não transformadas que passaram por regeneração *in vitro* seguindo o mesmo protocolo de cultura de tecidos utilizados para transformação de cana-de-açúcar.

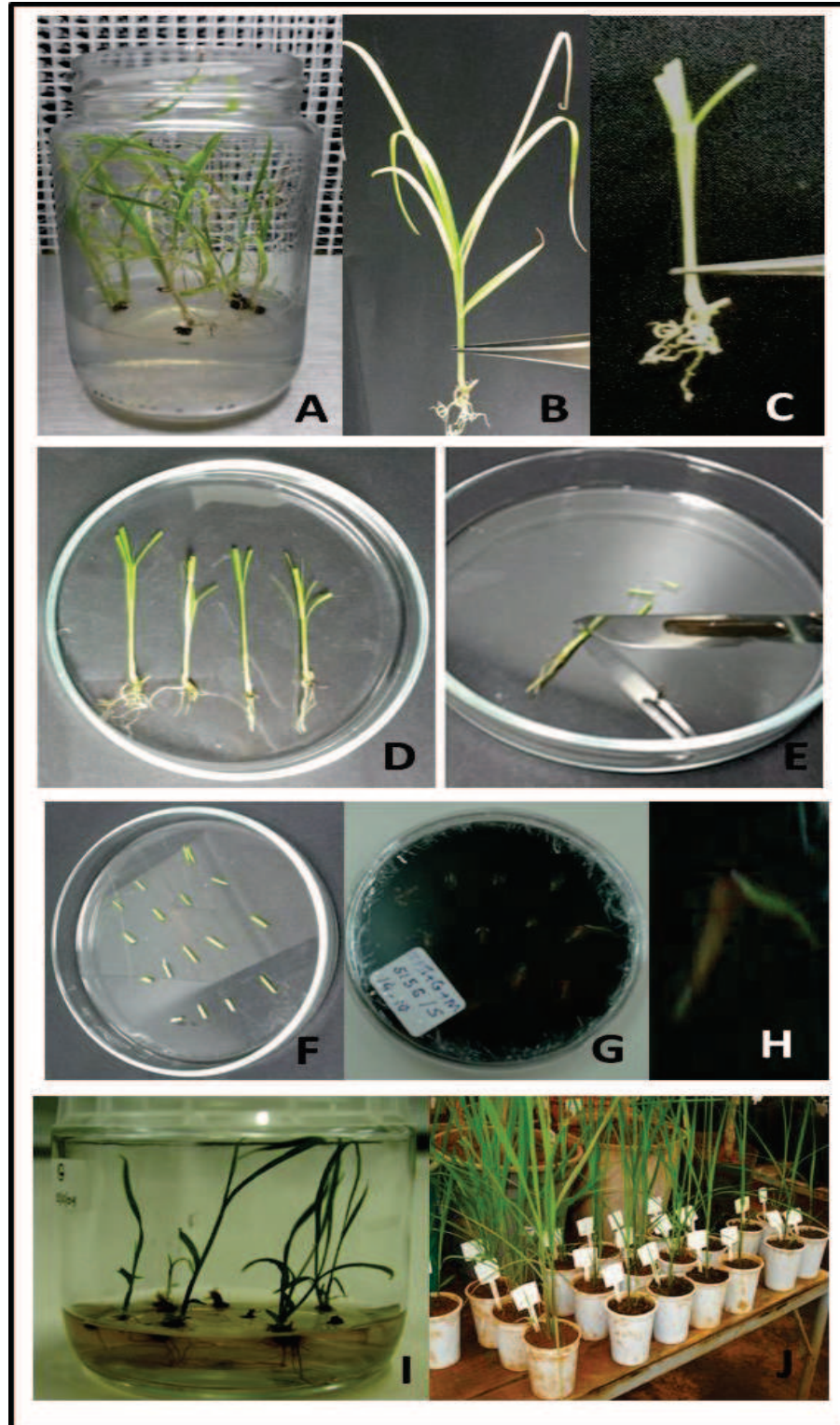


Fig. 4 Transformação genética de cana-de-açúcar por *Agrobacterium tumefaciens*. **A** – Plântulas de cana-de-açúcar regenerada *in vitro*. **B, C e D** – Plântulas de cana-de-açúcar individualizadas e preparadas para o corte do explante. **E**- Separação do explante para inoculação com a *Agrobacterium*. **F** – Explantes em meio seletivo contendo glutosinato de amônio. **G e H** – Brotos regenerando em meio seletivo. **I**- Regeneração de plantas transgênicas putativas. **J** – Cultivo das plantas em casa-de-vegetação.

Fonte: da autora

5.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico foi isolado de folhas dos eventos transgênicos putativos de cana-de-açúcar e da planta controle, não transformadas, de acordo com a metodologia descrita por Doyle & Doyle (1987). Após a extração, verificou-se a qualidade do DNA extraído em gel de agarose 1,0% (p/v) corado com brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) em tampão SB 1X e, após eletroforese, visualizado sob a luz UV. A concentração do DNA foi verificada em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), segundo recomendações do fabricante.

A técnica de PCR foi utilizada para detectar a presença do transgene *NPK1* nas amostras de DNA extraído. Os primers Sc_NPK1_RT_F: 5'-CTC TCC CAT CCC AAC ATA GTG AG-3' e Sc_NPK1_R: 5'-CGA GAT TGA GCC ACC AGG AAC-3' foram utilizados para amplificar um fragmento de 80 pb do transgene. A reação foi realizada em termociclador, na condição: 94°C por 5 min e 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 62°C, 45 seg a 72°C. Os produtos da reação foram separados por eletroforese em géis de agarose 1,0% (p/v), corado com brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) em tampão SB 1X e visualizados sob luz UV.

5.2.5 Experimento de déficit hídrico

Eventos transgênicos confirmados por PCR foram submetidos a um ensaio prévio de déficit hídrico por 12 dias. Destes, os eventos que apresentaram melhores taxas de fotossíntese e potencial osmótico foram selecionados para análises mais detalhadas.

Três clones de cada evento obtido a partir de cada método de transformação e de uma planta controle não transformada (NT) foram propagados vegetativamente e plantados em vasos plásticos de 3L com igual volume (3 Kg) de substrato (3 solo: 1 areia). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação com temperatura de 20-28°C e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de aproximadamente $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os vasos foram irrigados com 3L de água a cada 2 dias até as plantas completarem 4 meses.

Os vasos foram dispostos no delineamento experimental em blocos casualizados e as plantas foram submetidas ao estresse hídrico, sendo que cada repetição consistiu de uma planta multiplicada vegetativamente. Após 12 dias de suspensão do fornecimento de água, as plantas foram reidratadas. As coletas de tecido foliar para as análises foram realizadas aos 0, 6, 9 e 12 dias de estresse e na reidratação. Na folha +3 foram realizadas as análises

fisiológicas e a primeira folha expandida e as subsequentes foram destacadas, colocadas em N₂ líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C).

5.2.6 Análise transcricional do transgene

O RNA total foi extraído de folhas dos eventos transgênicos de cana-de-açúcar, confirmados por PCR, e das plantas controle, não transformadas, utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen). A qualidade do RNA foi verificada em gel de agarose a 1% (p/v), corado com brometo de etídeo (0,5 µg ml⁻¹), em tampão TAE 1X e, após eletroforese, visualizado sob luz UV. A concentração das amostras de RNA foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

Cinco microgramas de RNA de cada amostra foi tratado com a enzima DNase I (Invitrogen). A eficiência do tratamento foi confirmada através de PCR, utilizando primers do gene GAPDH, seguido de eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,5 µg ml⁻¹) em tampão SB 1X. Amostras de RNA livres de DNA foram utilizadas para síntese dos cDNAs utilizando o Kit ThermoScript RT-PCR (Invitrogen), de acordo com o protocolo descrito pela empresa. Primers para qPCR específicos para o transgene NPK1 foram desenhados e estão anteriormente descritos.

O perfil transcricional foi analisado com auxílio do aparelho Viia 7 Real-Time PCR (Applied Biosystems), utilizando o Master Mix SYBR Green (Applied Biosystems). O mix da reação continha 1X Master Mix, 0,2 uM primers e 1000 ng de cDNA em um volume total de 25 ul. As condições de ciclagem foram 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 62°C por 30 s. A curva de melting gerada para todos os produtos de amplificação foi analisada para confirmar a presença de um único produto de amplificação e a ausência de amplificação no controle negativo. Todas as reações foram feitas em triplicata e a eficiência de cada delas foi analisada *in silico* utilizando o programa LinRegPCR version 2013 (RAMAKERS *et al.* 2003). Os níveis de expressão relativa do transgene foram calculados utilizando o método comparativo $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), com o gene normalizador GAPDH. As amostras das plantas transgênicas sob condição normal no dia 0 foram utilizadas como calibrador (nível de expressão = 1).

5.2.7 Fotossíntese, transpiração e condutância estomática

A taxa de assimilação de CO₂ (fotossíntese líquida) em cada planta e em cada ponto de coleta foi obtida utilizando um sistema portátil de fotossíntese, modelo LI-6200 (LI-COR), expressa em $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As medidas foram feitas entre 9h e 10h30min, em condição de luminosidade natural, nas folhas mais ativas fotossinteticamente, classificadas como folha +3 segundo sistema de numeração estabelecido por Kuijper (adaptado de *DILLEWIJN*, 1952). Além da taxa de fotossíntese líquida, o sistema forneceu os valores de transpiração em $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A condutância estomática foi estimada através de um porômetro, nas mesmas folhas e condições de luminosidade descritas acima. Os valores foram expressos em $\text{mol H}_2\text{O (m}^{-2} \text{ s}^{-1})$.

5.2.8 Conteúdo relativo de água, potencial total de água e potencial osmótico

O conteúdo relativo de água (CRA) foi obtido usando a relação entre a diferença de peso fresco (P_f) e seco (P_s) com a diferença de peso túrgido (P_t) e seco (SMART & BINGHAM, 1974). O peso túrgido dos discos foliares foi obtido por um período de 24 horas de hidratação, com remoção do excesso de água da superfície dos tecidos e o peso seco dos discos obtidos em estufa de ar forçado, a 80°C por um período de 24 horas. O cálculo do CRA foi realizado através da fórmula $\text{CRA} = (P_f - P_s) / (P_t - P_s) \times 100$.

A quantidade de água nas folhas foi monitorada através de psicrômetros de termopar (modelo C-30, Wescor) acoplados a um datalogger (modelo CR-7, Campbell Scientific). A cada ponto de coleta (0, 6, 9 e 12 dias de estresse e reidratada), uma amostra de aproximadamente 2 cm² de folha totalmente expandida coletada na parte inferior de cada planta, sem sinal de dano, foi colocada nos psicrômetros. O datalogger foi programado para que as leituras fossem efetuadas a cada 10 min até que o equilíbrio da pressão de vapor na câmara fosse verificado. A microvoltagem fornecida pelo sistema foi convertida em potencial da água (MPa) em função de prévia calibração dos sensores com soluções de cloreto de sódio. Após a obtenção do potencial total da água (ψ_t), os sensores foram imersos durante 4 min em nitrogênio líquido e as leituras foram retomadas para obtenção do potencial osmótico (ψ_s). O cálculo do potencial de pressão foi realizado através da diferença entre de $\psi_t - \psi_s$.

5.2.9 Prolina e conteúdo de MDA

Folhas de cada um dos eventos transgênicos e da planta controle, em condições normais e de estresse hídrico, foram utilizadas para determinação da concentração de prolina baseada em curva-padrão, conforme descrito por Bates (1973), com algumas modificações. Aproximadamente 100 mg de tecido foliar macerados em N₂ líquido foram misturados com 5 ml de ácido sulfosalicílico (3%) e, em seguida foram centrifugados (10.000 rpm) por 5 min. Foram coletados 2 ml do sobrenadante e acrescentados 2 ml da solução de ácido nítrico (1,25 g de nítrina, 30 ml de ácido acético glacial, 20 ml de ácido fosfórico 6 M) e 2 ml de ácido acético glacial em tubos de centrífuga de 15 ml. As amostras foram então incubadas a 100°C por 1 h, em seguida, transferidas para gelo. Após resfriadas, foram adicionados 4 ml de tolueno e as amostras foram homogeneizadas por 20 s. O sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de prolina por espectrofotometria (520 nm) e as absorbâncias comparadas à curva padrão de prolina. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos expresso em nmol g MS⁻¹.

Também foi mensurado o conteúdo de malondialdeído (MDA), segundo protocolo descrito por Heath & Packer (1968). Cerca de 100 mg de tecido foliar macerado em N₂ líquido foram homogeneizados em 6,5 ml de solução 80:20 (v/v) etanol:água, seguido de centrifugação a 5200 rpm por 10 min. Do sobrenadante foi coletado 1 ml e colocado em um tubo de centrífuga de 15 ml e acrescentado 1 ml da solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v), ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,65% (p/v). As amostras foram misturadas vigorosamente e incubadas a 95°C por 25 min, em seguida, transferidas para gelo e, depois de resfriadas, centrifugadas novamente. As absorbâncias foram lidas nos comprimentos de onda de 532 nm e 600 nm. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos expresso em nmol g MS⁻¹ de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Equivalentes de MDA (nmol ml}^{-1}\text{)} = [(A_{532}-A_{600})/155000] \times 10^6$$

Onde: A₅₃₂ indica a absorbância máxima do complexo MDA-TBA a 532 nm

A₆₀₀ indica a absorbância a 600 nm, que corrige interferentes não-específicos

155000 é o coeficiente de extinção molar para o MDA

5.2.10 Conteúdo de Clorofila total

O conteúdo de clorofila total foi determinado para todos os dias do experimento de estresse hídrico a partir de 100 mg de tecido foliar macerado em N₂ líquido. A extração de clorofila foi feita em acetona 80% e a quantificação em espectrofotometria, nos comprimentos de onda de 663 e 645 nm. As análises dos conteúdos de clorofila foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos expresso em ug g MS⁻¹, de acordo com as equações descritas por Arnon (1949):

$$\text{Clorofila total (ug ml}^{-1}\text{)} = 20,2 (A_{645}) + 8,02 (A_{663})$$

5.2.11 Determinação da biomassa

No final do experimento as plantas de cana-de-açúcar (parte aérea e de raiz) foram secas em estufa a 80°C com circulação de ar até atingirem massa constante. Para determinação da massa seca, três plantas de cada tratamento [NT; T(A) e T(B)] foram pesadas em balança de precisão e os valores expressos em miligramas.

5.2.12 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi fatorial (3X5) em blocos casualizados com três repetições, e os tratamentos foram um evento obtido a partir de cada método de transformação biobalística e *Agrobacterium* e de um controle planta não transformada, sendo que cada repetição consistiu de uma planta multiplicada vegetativamente. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (2005) para delineamentos em blocos completos casualizados, arranjo fatorial, segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = m + b_j + t_i + d_k + (td)_{ik} + e_{ijk}$$

Onde: Y_{ijk} = é a observação do tratamento i , no dia k na repetição j ,

m = média geral,

t_i = é o efeito de tratamentos i , sendo $i=1, 2, \dots, q$,

d_k = é o efeito de dia k , sendo $k=1, 2, \dots, w$,

$(td)_{ik}$ = é o efeito da interação entre tratamentos i e dia k ,

$b_{j(k)}$ = é o efeito do bloco j , sendo $j= 1,2,3\dots, r$,
 e_{ijk} = é o erro experimental.

As comparações múltiplas entre as médias foram realizadas com aplicação do teste F e teste Tukey a 5% de significância.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Transformação genética e seleção dos eventos

Foram obtidos eventos de transformação genética pelos dois métodos utilizados (biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*), seguindo os passos ilustrados nas Figuras 1 e 2. Estas plantas foram aclimatadas em casa-de-vegetação para posterior análise de resistência ao glufosinato de amônio à concentração de 1% (fórmula comercial 200g/l). Foi pulverizado o herbicida nas folhas das plantas para análise da tolerância pelas plantas transgênicas. Após este teste, apenas 12 plantas se mostraram tolerantes e nenhuma diferença morfológica aparente foi observada nestas plantas transgênicas quando comparadas a plantas não transformadas.

Depois de confirmada a tolerância ao herbicida, os quatros eventos transgênicos, dois eventos obtidos via infecção por *Agrobacterium* (Agro1 e Agro2) e dois via biobalística (CV7 e CV9), que apresentaram as melhores taxas de fotossíntese e potencial osmótico (dados não apresentados), em ensaio prévio de déficit hídrico, foram submetidos em ensaio de suspensão de rega por 12 dias e re-irrigado. Dados fisiológicos, bioquímicos e moleculares referentes a plantas do melhor evento de cada método de transformação - *Agrobacterium* [T(A)] e biobalística [T(B)] – em comparação com plantas não-transformadas (controle) foram obtidos para avaliação da tolerância à seca.

5.3.2 Análise da inserção do transgene

Para confirmar a inserção do transgene *NPK1* no genoma de cana-de-açúcar, foi extraído o DNA dos eventos transgênicos putativos para análise por PCR (reação em cadeia

da polimerase). As plantas tolerantes ao herbicida apresentaram o fragmento esperado de 80 pb do transgene *NPKI*. Na Figura 5 é apresentado o resultado da amplificação para os eventos Agro1, Agro2, CV7 e CV9 e, como esperado, do controle não transformado, mas que passaram pelo mesmo protocolo de regeneração, não apresentou o fragmento.

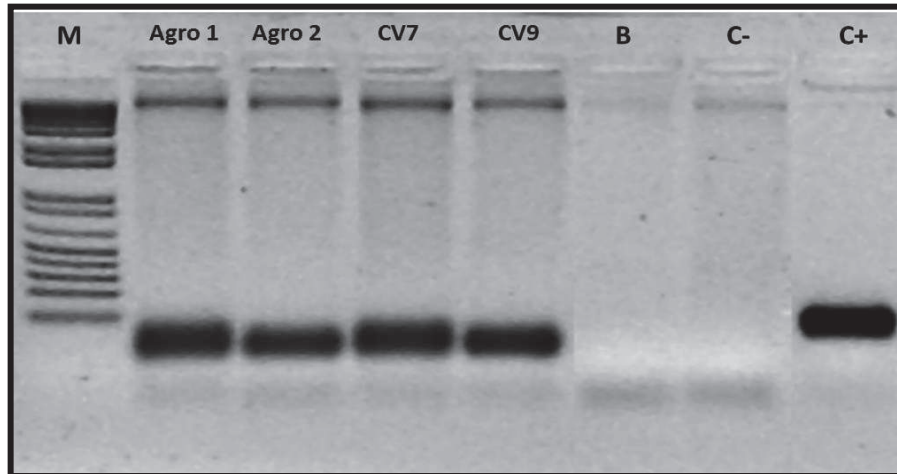


Fig. 5 Análise da presença do transgene *NPKI* em eventos transgênicos putativos de cana-de-açúcar. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados a partir do DNA de folhas de cana-de-açúcar. **M**: marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen); **Agro1**, **Agro2**, **CV7**, **CV9**: diferentes eventos de transformação; **C-**: planta controle não transformada; **B**: branco (água); **C+**: plasmídeo pSHX004.

5.3.3 Experimento de estresse hídrico

5.3.3.1 Análises fisiológicas

A condutância estomática, assim como a taxa de fotossíntese, não apresentou diferença estatística entre as planta controle e transgênicas antes do início do estresse hídrico (Figura 6-A, B). Já para a taxa de transpiração teve variação de aproximadamente 6 - 8 mol H₂O m² s⁻¹ entre as plantas, sendo que as planta controles tiveram o menor índice de transpiração (Figura 6-C). As taxas de perda de água nas folhas destacadas de *Arabidopsis* superexpressando *ZmMKK1* foi menor do que na planta controle sob condições de seca, sendo que a abertura de estômatos das plantas transgênicas também foi menor do que da planta controle (CAI *et al.*, 2014). Estes autores sugerem que *ZmMKK1* pode desempenhar um papel

importante na resposta a tolerância osmótica através da regulação da abertura estomática e que estes genes são responsivos ao estresse através da via dependente de ABA.

Nos dias 6, 9 e 12 após a suspensão da irrigação, a condutância estomática foi afetada negativamente tanto nas planta controle como nos eventos transgênicos, mas as planta controles apresentaram valores menores em relação aos eventos transgênicos. Após o período de 72 h de re-irrigação, os dois eventos mostraram valores de condutância estomática superiores ao controle não transformado, mas somente o evento T(A) recuperou o nível do início do estresse hídrico, em torno de $0,32 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 6-B).

Em plantas de arroz transgênico expressando uma proteína quinase dependente de calcio de arroz OsCPK9 apresentaram maior fechamento de estômatos em relação a planta controle em tratamento de seca, o que pode contribuir para a redução da perda de água (WEI *et al.*, 2014). Estes resultados mostram evidências fisiológicas que a proteína quinase confere tolerância ao déficit hídrico, aumentando a capacidade de ajustamento osmótico da planta por promover o fechamento dos estomato, reduzindo assim a perda de água (WEI *et al.*, 2014)

A taxa de fotossíntese líquida, nas plantas de cana-de-açúcar controle e T(A), mostraram maior redução após 9 e 12 dias de estresse hídrico (Figura 6-A), enquanto que as plantas do evento T(B) apresentaram os maiores valores de fotossíntese durante todo o experimento de suspensão de irrigação em média $12 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As taxas de fotossíntese dos eventos transgênicos de milho superexpressando o gene *NPKI* foram significativamente maiores do que as planta controle em condições de seca. O evento que teve a maior taxa de fotossíntese em condições de seca, também teve o maior nível de transcritos do transgene, apresentando uma correlação positiva. Estes resultados sugerem que a expressão constitutiva do gene *NPKI* em milho protegeu a maquinaria fotossintética sob estresse hídrico (SHOU *et al.*, 2004a).

Os eventos transgênicos de cana-de-açúcar mostraram um aumento na taxa fotossintética em relação ao controle, indicando uma proteção da maquinaria fotossintética, particularmente da fotossistema II (PS II), durante o estresse hídrico (AUGUSTINE *et al.*, 2015). Em análises de fotossíntese líquida e condutância estomática de plantas de cana-de-açúcar transgênica com *AtDREB2A CA* sob restrição de água mostrou que as concentrações de CO_2 acumulado como o estresse foi maior para as planta controles. Esta acumulação de CO_2 indica uma limitação dos processos de assimilação de CO_2 . É possível que no início do estresse hídrico possa ter ocorrido danos de senescência nas planta controle em comparação com as transgênicas e isto levou a uma diminuição na quantidade e atividade da Rubisco, o

mesmo pode ter ocorrido nas planta controle deste estudo (JIANG *et al.*, 1993, OLSSON, 1995, REIS *et al.*, 2014).

Como a principal fonte de energia para as plantas é a fotossíntese, a preservação da atividade fotossintética e sua proteção pode ter contribuído significativamente para a capacidade da planta em suportar o estresse (MACKOVÁ *et al.*, 2013). Os eventos de cana-de-açúcar com o fator de transcrição EaDREB2 tiveram maiores teores de clorofila, contribuindo assim para manutenção da maior capacidade fotossintética sob estresse hídrico. A redução no conteúdo de clorofila tem sido observada em diferentes espécies de plantas e a intensidade depende da duração do estresse hídrico (RENSBURG VAN, 1994, KYPARISSIS *et al.*, 1995, JAGTAP *et al.*, 1998).

Em condições normais de cultivo, no início do experimento, as taxas de transpiração foram diferentes para as plantas transgênicas e planta controle (Figura 6-C), mostrando que cada evento apresentou comportamento diferente em situação normal de cultivo. Com o estabelecimento do estresse hídrico, a taxa de transpiração da planta controle diminuiu e chegou a $4,8 \text{ mols H}_2\text{O m}^2 \text{ s}^{-1}$ no sexto dia. Valores semelhantes para as plantas transgênicas T(A) e T(B) só foram alcançados no dia 12 ($4,3$ e $4,7 \text{ mols H}_2\text{O m}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente). No ponto de restabelecimento da irrigação, as plantas transgênicas conseguiram recuperar a taxa de transpiração do início do experimento, em torno de $6 \text{ mols H}_2\text{O m}^2 \text{ s}^{-1}$. Já as plantas não transformadas não conseguiram melhorar o índice de transpiração após reestabelecida a irrigação. Em estudos de Muoma & Ombori, 2014 com plantas de milho transgênicas com o gene *NPK1*, quando submetidas ao estresse hídrico tendem a enrolar as suas folhas, diminuindo a área de superfície, reduzindo a taxa de transpiração resultando em melhor crescimento padrão das plantas transgênicas. Em *Arabidopsis* mutante com dublo gene *AtMPK9/AtMPK12* levou as plantas transgênicas a perder menos água pela transpiração que as plantas selvagens. (KWAK *et al.* 2009).

Utilizando a análise de *microarray*, Shou *et al.* (2004b) detectaram um aumento da regulação de um pequeno fragmento do gene *HSP* no milho transgênico *NPK1* quando comparados com plantas não-transgênicas. As HSPs desempenham um papel importante na termotolerância e pode estar envolvida na proteção dos fotossistemas sob o estresse hídrico (MAESTRI *et al.*, 2002). A expressão de HSP70 em batata e milho conferiu uma maior tolerância ao estresse térmico, juntamente com a melhoria dos parâmetros fisiológico como melhor eficiência no uso da água e de nutrientes, a fotossíntese, a partição de assimilados e estabilidade da membrana (AHN & ZIMMERMAN, 2006, MOMCILOVIC & RISTIC,

2007). Essas melhorias possibilitou maior crescimento e desenvolvimento das plantas sob estresse térmico e hídrico.

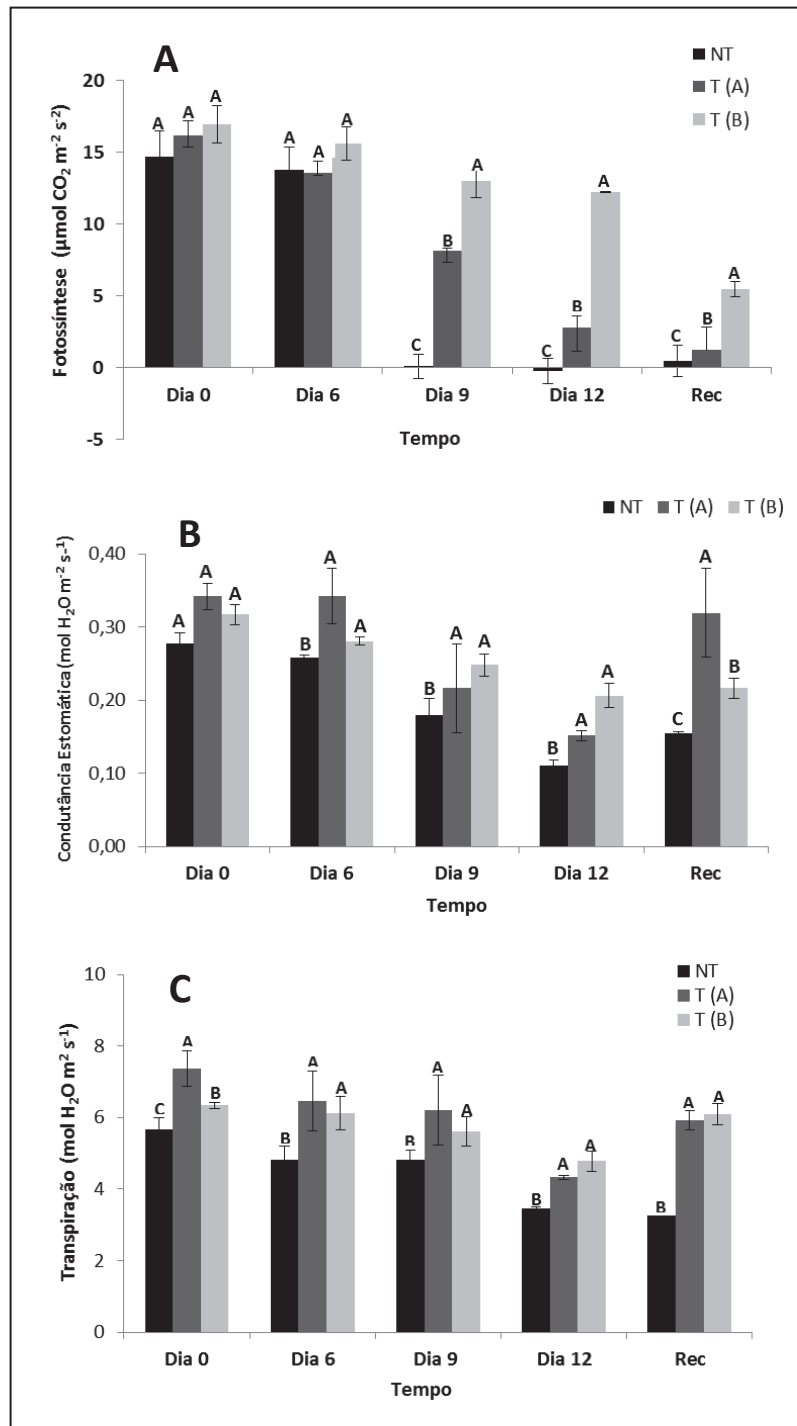


Fig. 6 Fotossíntese, condutância estomática e transpiração em plantas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPK1* e plantas controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE ($n=3$). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%).

5.3.3.2 Relações hídricas nas folhas

O elevado nível de água nas plantas é uma indicação de tolerância à seca e salinidade e pode ser expressa como conteúdo relativo de água (CRA) (FLOWER & LUDLOW, 1986). O CRA dos eventos transgênico e da planta controle apresentaram valores próximos de 80% no início do experimento. No sexto e nono dia houve uma redução na planta controles, com queda de aproximadamente 10% nos valores de CRA. Queda semelhante foi verificada para o evento T(B) apenas no décimo segundo dia de estresse hídrico, sendo que neste mesmo dia as planta controles apresentaram 67% do valor de CRA inicial. No nono dia os eventos transgênicos apresentaram diferença significativa nos valores de CRA onde o evento tem T(A) 77% e o evento T(B) 83% (Figura 7).

O evento T(B) manteve valores de CRA de 83% até o nono dia. No décimo segundo dia ele chegou a 74% recuperando o seu índice na re-hidratação. Já o evento T(A) apresenta índice de CRA de 83% até o sexto dia e depois mantém o seu índice em 77% até o final do experimento. Já as planta controles apresentam 83% de CRA em condições normais e re-hidratação, e uma queda acentuada no decorrer do estresse atingindo 67% de CRA. A pequena variação do CRA das plantas transgênicas sob estresse hídrico é um bom indicador que as células e os tecidos foliar estão hidratados (Fig. 7), e sugere que a planta se encontra sob ajustamento osmótico, que é um fator crucial para manter as funções fisiológicas tais como o controle dos estômatos (GORAI *et al.* 2010). Altos valores de CRA durante a escassez de água é um forte indicativo de tolerância à seca em cultivares de cana (SANTOS & SILVA, 2015).

Os altos índices de CRA sob desidratação e estresse salino pode ser atribuído ao ATHK1 em plantas transgênicas de *Lycium barbarum*, este resultado sugere que houve uma menor transpiração e um aumento da absorção de água nos eventos transgênicos (CHEN *et al.*, 2009). Em plantas de arroz e cana-de-açúcar transformadas com fatores de transcrição em condições de seca apresentaram maior CRA, melhorando o turgor, menor redução no crescimento de parte aérea e raiz, e estabilidade da membrana das células. (CHANDRA BABU *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2014; AUGUSTINE *et al.*, 2015). Estes resultados corroboram com estudos anteriores com plantas transgênicas, como grão de bico, amendoim,

sorgo e milho submetidos ao estresse hídrico (NAGY *et al.*, 1995; EL HAFID *et al.*, 1998; BHUSHAN *et al.*, 2007; CHANDRA & DUBEY, 2010).

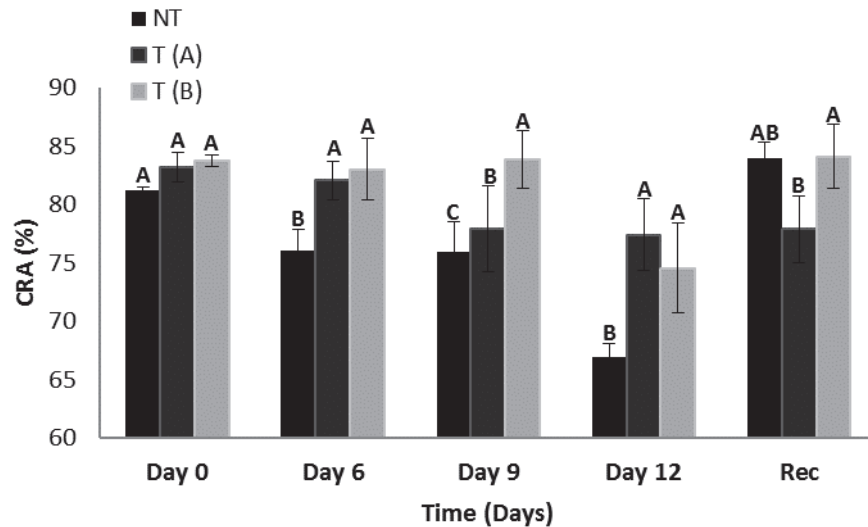


Fig. 7 Conteúdo relativo de água em plantas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPK1* e plantas controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE (n=3). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%).

Em trabalho de Ritchie *et al.* (1990), foi relatado uma melhor regulação osmótica e maiores índices de CRA em diferentes genótipos de trigo tolerante a seca, o mesmo foi observado em plantas transgênicas de cana-de-açúcar super-expressando uma proteína de choque térmico - EaHSP70 que mantiveram altos índices de CRA em relação a planta controle (AUGUSTINE *et al.*, 2015b). A sobrevivência das plantas sob múltiplas e simultâneas condições ambientais implica em processos complexos de recepção de sinal, transmissão, ampliações e interação envolvendo um grande número de MAP quinase e genes responsivos ao estresse (MOUSTAFA *et al.*, 2014). Uma MAP quinase ativada pelo choque térmico acumulou HSP70, em tabaco, sugerindo que as MAP quinases podem desencadear uma cascata de sinalização (SURI & DHINDSA 2008). As respostas ao calor incluem a produção e ativação de proteínas de choque térmico (HSPs), fatores de transcrição de choque térmico (HSFS), removedores de ROS, antioxidantes, solutos compatíveis, quinases dependentes de cálcio proteína (CDPKs) e as MAP quinases (MOUSTAFA *et al.*, 2014).

O potencial de sobrevivência de uma planta a déficits hídricos severos depende da sua capacidade em restringir a perda de água através da epiderme das folhas após os estômatos ter

atingido a abertura mínima (EL JAAFARI, 2000). Há correlação entre a taxa fotossintética e potencial hídrico foliar, condutância estomática e taxa de transpiração (KRAMER & BOYER, 1995). Em condições normais, as planta controle e as transgênicas apresentaram valores de potencial total da água de cerca de -1,50 MPa (Figura 8-A) e de potencial osmótico de cerca de -1,40 MPa (Figura 8-B). No sexto dia houve uma queda acentuada nos valores do potencial da água e do potencial osmótico das planta controle para próximo de -2,60 MPa. No entanto, os dois eventos de transformação mostraram valores mais próximos ao do dia 0 em relação ao potencial de água (-1,92 MPa e -1,99 MPa) e potencial osmótico (-1,90 MPa e 1,87 MPa) (Figura 8-A, B).

No nono dia as plantas transgênicas apresentaram uma queda menos acentuada nos valores de potencial total e osmótico, em torno de -2,3 MPa, sendo que as planta controles atingiram -3,7 MPa neste mesmo dia. Estes mesmos níveis só foram atingidos no dia 12 pelo evento T(A) e 72h após de re-irrigação pelo evento T (B) (Figura 8-A, B).

Nos dias 9, 12 e ponto de re-hidratação, as plantas do evento T(B) apresentaram uma queda um pouco mais acentuada do que as do evento T(A), para ambos os potenciais. No último ponto de coleta as plantas de ambos os eventos e as plantas não transformadas não conseguiram se recuperar após o período de supressão de água (Figura 8-A, B).

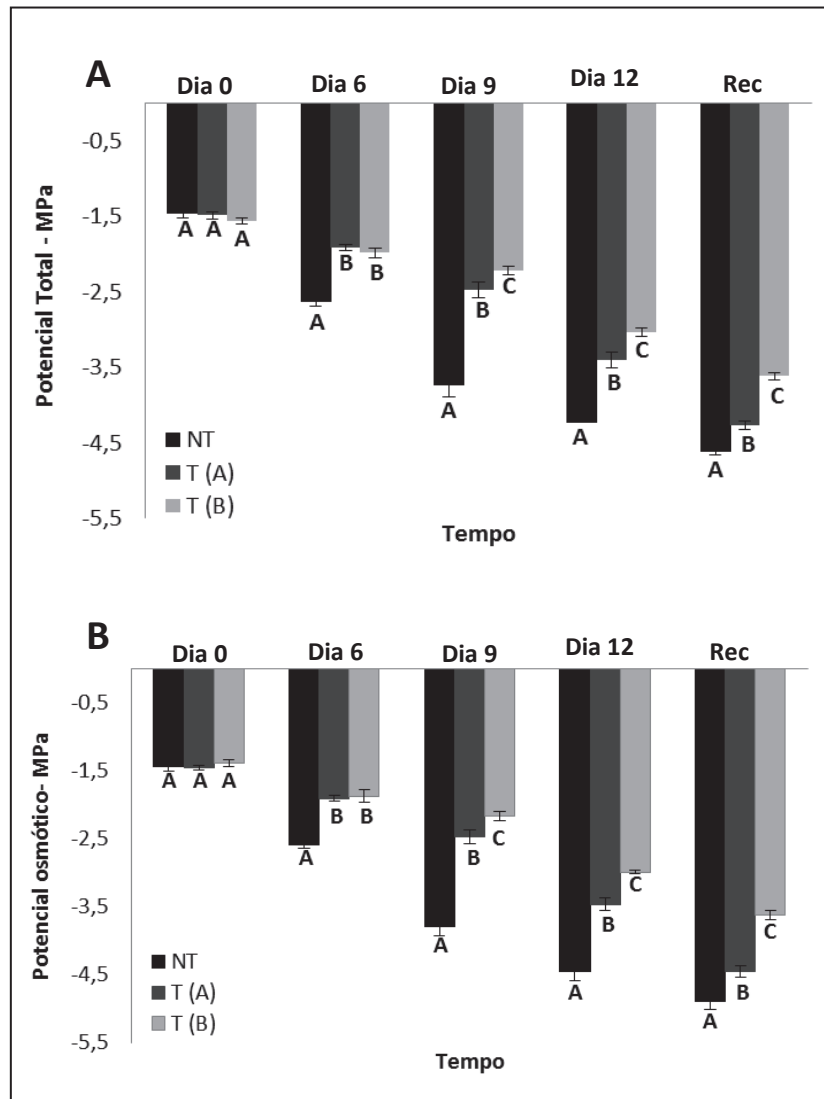


Fig. 8 Potencial total de água e potencial osmótico em plantas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPKI* e plantas controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE ($n=3$). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%).

No trabalho de Reis *et al.* (2014) o potencial hídrico e o CRA revelaram que o nível de estresse foi moderado para as plantas de cana transgênica com o fator de transcrição DREB 2A apresentando valores de -1,5 Mpa e 85% respectivamente até o final do experimento. Segundo Lawlor (2013), o atraso na redução do potencial de água das folhas pode ser causado pela menor taxa de transpiração, como consequência de uma menor abertura estomática das plantas transgênicas. Para as plantas de cana DREB2A a melhor resposta à seca das plantas transgênicas não foi associada a taxas de transpiração alteradas pelo fechamento dos

estômatos ou área foliar reduzida (REIS *et al.*, 2014), o que corrobora com os dados obtidos neste estudo, onde as taxas de transpiração e condutância estomática foram maiores para as plantas transgênicas, conferindo um atraso na redução do potencial total e osmótico das plantas transgênicas. Outras características determinam a perda de água nas plantas, tais como área foliar e condutância estomática (LAWLOR, 2013), resistência do mesófilo, número de estômatos por unidade de área foliar e estrutura dos estômatos (HOLMSTRON *et al.*, 1996) e da permeabilidade de água de célula-célula mediada por uma abundância de aquaporinas (YOOYONGWECH *et al.*, 2013). Portanto, estes parâmetros devem ser avaliados em outros estudos com plantas transgênicas de cana *NPKI*.

5.3.3.3 Prolina, MDA e conteúdo de clorofila

A prolina contribui na estabilidade da membrana (ASHRAF & HARRIS, 2004; HANSON & BURNET, 1994). Ela atua como um osmólito importante (BEHERA *et al.*, 2003), permitindo o ajuste osmótico sob déficit hídrico. (NANJO *et al.*, 1999; VERSLUES & BRAY, 2004).

Quando a água é limitante, as plantas acumulam osmólitos compatíveis tais como açúcares solúveis e prolina para diminuir o potencial osmótico. Em linhagens de arroz super-expressando *OsCPK9*, mostraram que houve aumento nos teores de prolina interferindo diretamente nas funções de ajustamento osmótico, melhorando a capacidade da planta em reter água durante a seca (WEI *et al.*, 2014). No início do nosso experimento (Figura 9), em condições normais de cultivo, as planta controle e transgênicas já apresentaram diferenças significativas nas concentrações de prolina livre em folhas, com o menor conteúdo observado nas plantas transgênicas. Nos dias 6 e 9 de estresse hídrico houve uma redução acentuada nas concentrações de prolina para todas as plantas, porém o evento T(B) apresentou maior conteúdo de prolina livre em relação ao evento T(A) e controle.

No décimo segundo dia de estresse hídrico, os eventos transgênicos tiveram um grande aumento na concentração de prolina, apresentando aproximadamente 56% mais prolina nas folhas do que as planta controle. No ponto recuperado, 72 h após re-irrigação, as plantas do evento T(A) reduziu o nível de prolina para valores próximos ao do dia 0, aproximadamente 15 $\mu\text{moles g}^{-1}$, e a concentração de prolina nas plantas do evento T(B) estava 2 vezes mais alta que no início do experimento (Figura 9).

O aumento do acúmulo de prolina nas variedades estudadas sob estresse hídrico sugere que este aminoácido pode estar envolvido no mecanismo de regulação osmótica e de defesa antioxidante, contribuindo para o equilíbrio ROS nas folhas, como relatado em estudos anteriores em a cana sob estresse hídrico (MOLINARI *et al.*, 2007; CIA. *et al.*, 2012; HEMAPRABHA *et al.*, 2013).

A superexpressão do gene *ZmMKK4*, em *Arabidopsis* e tabaco resultou no aumento da atividade da P5CS2 (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase B), levando ao aumento no teor de prolina e tolerância ao estresse hiperosmótico (frio e sal) (KONG *et al.*, 2011a, b). A MAPK desempenha um papel importante mediando a regulação do sistema antioxidante sob condição de estresse. No estudo de Zong *et al.* (2009), a superexpressão de *ZmMPK7* no tabaco transgênico aumentou a atividade da POD, que protegeu a planta contra os efeitos de ROS durante o estresse osmótico. Em estudos de Lin *et al.* (2009) e Zhang *et al.* (2006) mostraram que *ZmMPK5* aumentou a expressão dos genes antioxidantes CAT1, cAPX e GR1, e a atividade das enzimas antioxidantes CAT, ascorbato POD, glutaciona redutase e superóxido dismutase. Em *Arabidopsis*, AtMKK1 e AtMPK6 estão envolvidos na produção de H₂O₂ induzida por ABA e a expressão de CAT1 (XING, JIA & ZHANG 2007, 2008).

A expressão de transcritos que codificam proteínas para o metabolismo de prolina de eventos transgênicos de cana-de-açúcar expressando o gene *AtDREB2A CA* sob o controle do promotor responsivo a seca *Rab17*, foi observado em condições de estresse hídrico (REIS *et al.*, 2014), sugerindo que esse aminoácido melhorou a tolerância ao estresse hídrico. Molinari *et al.* (2007) trabalhando com plantas de cana transgênicas superexpressando o gene P5CS (Delta 1-Pirrolina-5-carboxilato sintetase) para síntese de prolina mostrou que este aminoácido protegeu as plantas contra o estresse oxidativo causado pelo déficit de água.

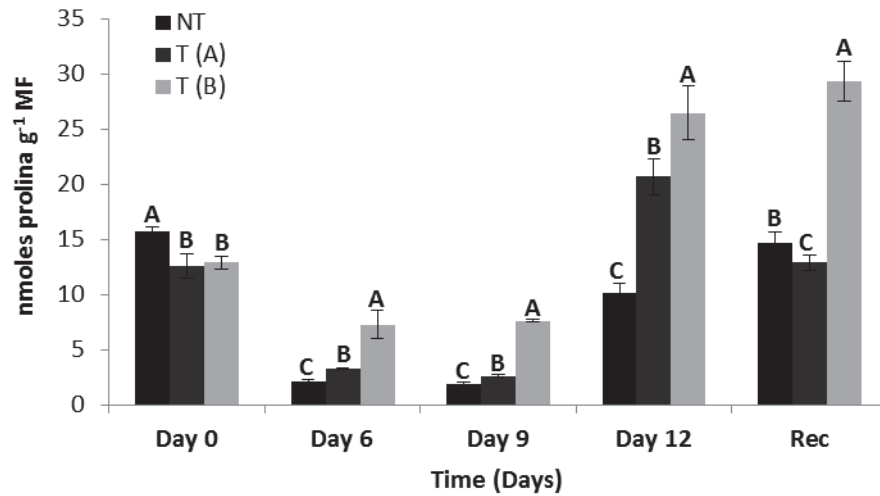


Fig. 9 Conteúdo de prolina livre em folhas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPK1* e plantas controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE (n=3). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%).

ROS em altas concentrações são altamente citotóxicos, e levam a danos no DNA, peroxidação de lípidos e degradação de proteínas (SUN, 1990), bem como danos da membrana resultando no vazamento de eletrólitos (APSE & BLUMWALD, 2002). A peroxidacao de lipídios é um indicador eficaz de danos celular oxidativo e pode ser medido por mudanças no conteúdo de MDA em folhas (PARVANOV *et al.*, 2004).

As células vegetais possuem uma complexo sistema de antioxidante para a desintoxicação de ROS, que consiste em enzimas não-enzimáticas e antioxidantes (MILLER *et al.*, 2010). Estudos anteriores demonstraram que a cascata MAPK pode melhorar o sistema de defesa antioxidante em fumo (ZONG *et al.*, 2009). Em linhagens de *Arabidopsis* transgênicas com gene de MAPKK de milho (*ZmSIMK1*) houve produção de altos níveis de antioxidantes, como o ácido ascórbico e prolina, em comparação com planta controle sob estresse hídrico (CAI *et al.*, 2014).

Os teores de MDA (Figura 10), um produto da peroxidação de lipídeos, não apresentaram grandes variações em todos os eventos até o dia 12 de estresse hídrico, com valores próximos a 100 nmol g⁻¹. Os eventos transgênicos apresentaram menor acúmulo de MDA, quando comparados com a planta controle no dia 12 e após a re-irrigação. No ponto de recuperação, os níveis de MDA nas planta controle foram em média 60% maiores do que nas plantas transgênicas (Figura 10).

Houve um aumento significativo do conteúdo de MDA em plantas não-transgênicas de *Lycium barbarum*, comparado com as plantas transgênicas expressando o receptor (*Arabidopsis* histidina Kinases) ATHK1 sob seca e estresse salino, mostrando uma maior tolerância destas plantas transgênicas frente ao estresse osmótico (CHEN *et al.*, 2009).

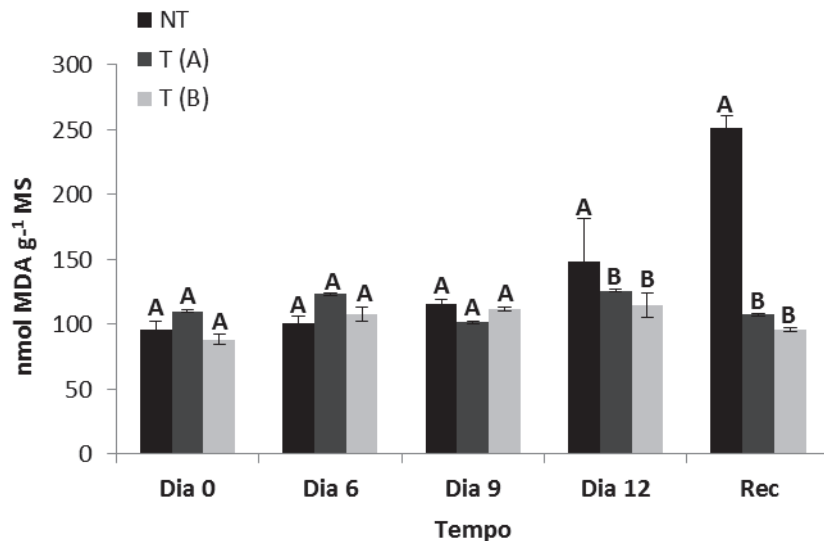


Fig. 10 Conteúdo de malondialdeído (MDA) em plantas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPK1* e plantas controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE (n=3). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%).

A capacidade fotossintética da planta é indicada pelo teor de clorofila e a estimativa no teor de clorofila total pode ajudar a compreender a tolerância aos estresses abióticos em plantas (NAGESWARA *et al.*, 2001; AUGUSTINI *et al.*, 2015b). No início do experimento (Figura 11), em condições normais de regime de água, ambos os eventos transgênicos e o controle não transformado apresentaram diferentes concentrações de clorofila total. No dia 6 e 9 sem irrigação os eventos transgênicos e controle não mostraram diferença estatística para medidas do conteúdo total de clorofila. Os conteúdos de clorofila total diminuíram com o decorrer do estresse hídrico.

Mudanças no teor de clorofila são fundamentais para a compreensão de uma resposta da planta ao meio ambiente no qual ela se encontra (SCHLEMMER *et al.*, 2005). Medidas do conteúdo de clorofila revelaram que segmentos foliares de plantas transgênicas após o décimo segundo dia de estresse apresentaram maiores concentrações de clorofila total em relação a planta controle (Figura 11-A). No último dia de estresse e após o período de re-irrigação, os

segmentos foliares de planta controle apresentaram uma diminuição da concentração de clorofila total, porém nas plantas transgênicas manteve-se similar às condições normais de suprimento de água (Figura 11-A).

De acordo com Altinkut *et al.* (2001), redução nas concentrações de clorofilas pode estar associado com um mecanismo de fotoproteção para evitar a destruição dos cloroplastos. Em eventos transgênicos de cana-de-açúcar com EaHSP70, apresentaram maiores teores de clorofila sob restrição de água permitindo que as células mantivessem o cloroplasto funcional ajudando a planta a restabelecer a fotossíntese após o estresse. (AUGUSTINI *et al.*, 2015b).

A degradação da clorofila é uma das consequências do estresse que podem resultar na fotoinibição e redução da eficiência fotossintética entre outros processos celulares (LONG *et al.* 1994; MURCHIE & NIYOGI, 2011). O estresse oxidativo nos cloroplastos, pode contribuir para o aumento da produção de ROS, resultando em danos no aparato fotossintético SOOD *et al.* (2011), como foi observado nas plantas controle deste estudo. Já nas plantas transgênicas, o inverso foi constatado, com pouca degradação nos níveis de clorofila total assim como observado em folhas de plantas transgênicas de *Lycium barbarum* L. sob estresse hídrico onde a degradação de clorofila foi muito menor do que na planta controle (CHEN *et al.*, 2009).

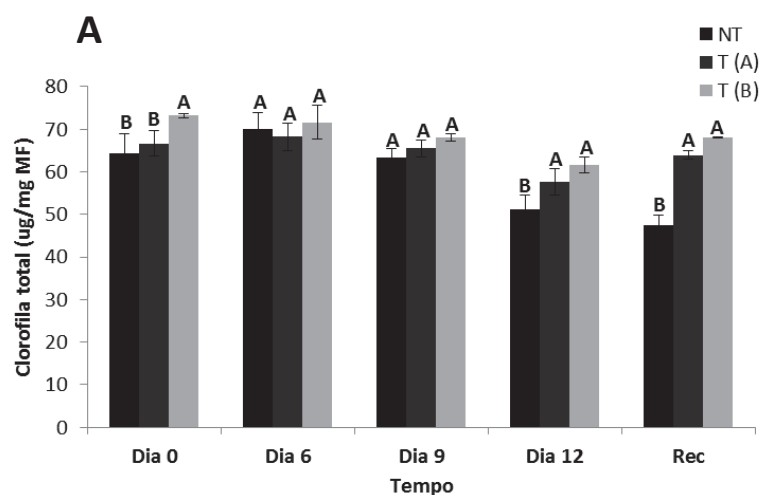


Fig. 11 Clorofila total em plantas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPK1* e plantas controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE ($n=3$). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%).

5.3.3.4 Avaliações de biomassa

Os resultados mostraram diferenças significativas de matéria seca acumulada pelas raízes das plantas do evento T(A) em relação às planta controle e do evento T(B). As plantas do evento T(A) acumularam em média 35% mais massa seca nas raízes do que as planta controle e T(B). Já para a massa seca da parte aérea (folhas mais colmos), todos os eventos transgênicos e o controle apresentaram valores semelhantes próximos a 165 mg de peso seco (Figura 12).

A altura e número de folhas de plantas de milho transgênico *NPK1* no estágio fenológico R1 de 22 eventos foram avaliados sob estresse hídrico. Para as características avaliadas, não houve nenhuma diferença significativa entre os eventos transgênicos e controle, indicando que a expressão do gene *NPK1* não tem nenhum efeito negativo sobre o crescimento de plantas de milho (SHOU et al., 2004c). Em estudo com plantas de milho transgênico *NPK1* apresentaram um aumento na tolerância à seca, incluindo taxas mais elevadas de fotossíntese, maior número de folhas e maior peso de grãos comparado com a planta controle (SHOU et al., 2004a). Em estudo de Muoma & Omboria (2014), plantas de milho transgênico expressando o gene *NPK1* apresentaram maiores índices para largura da folha sob estresse hídrico.

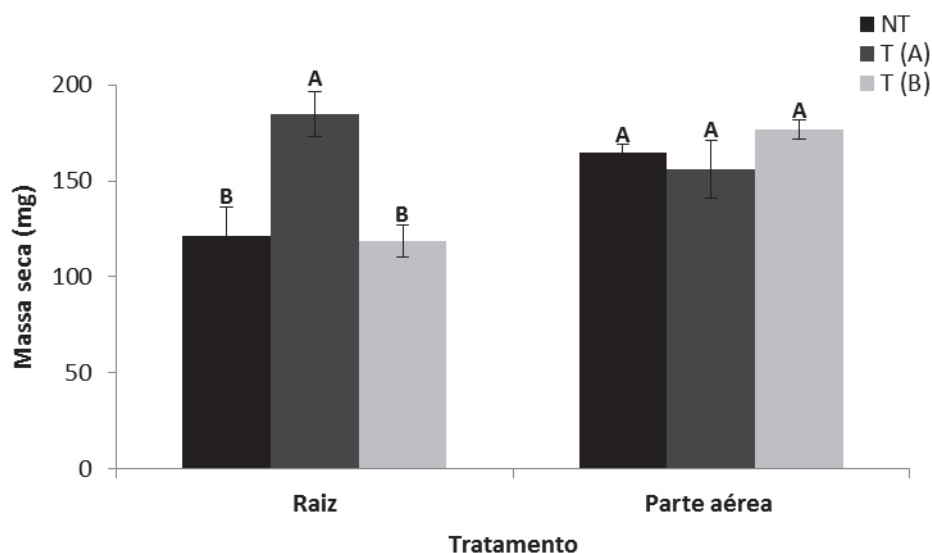


Fig. 12 Massa seca de raiz e parte aérea em plantas de cana-de-açúcar T (A) e T (B) transformadas com gene *NPK1* e plantas controle não-transformadas (NT) durante 12 dias de suspensão de rega e 3 dias após reidratação (Rec). Valores são apresentados pela média \pm SE (n=3). Letras comparam planta controles e transgênicas no mesmo dia de estresse. Letras iguais representam não haver diferença estatística entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%).

5.3.3.5 Análise da expressão do transgene

A expressão do transgene *NPkI* durante o ensaio de restrição de água foi avaliado através da técnica de qPCR, através do cálculo do método comparativo $\Delta\Delta Ct$. O dia 0 foi utilizado para calibração dos dados. No dia 6, o evento de transformação via *Agrobacterium* – T(A), apresentou 1,6 vezes mais expressão e o evento de transformação por biobalística - T(B), apresentou redução na expressão (Fig. 13). Já no dia 9 e 12 ambos os eventos tiveram o mesmo comportamento na expressão do transgene. Eles reduziram a expressão em relação ao dia 6. Ao final do ensaio, após a recuperação das plantas, os níveis de expressão do transgene chegaram próximos a zero em ambos os eventos (Fig. 13).

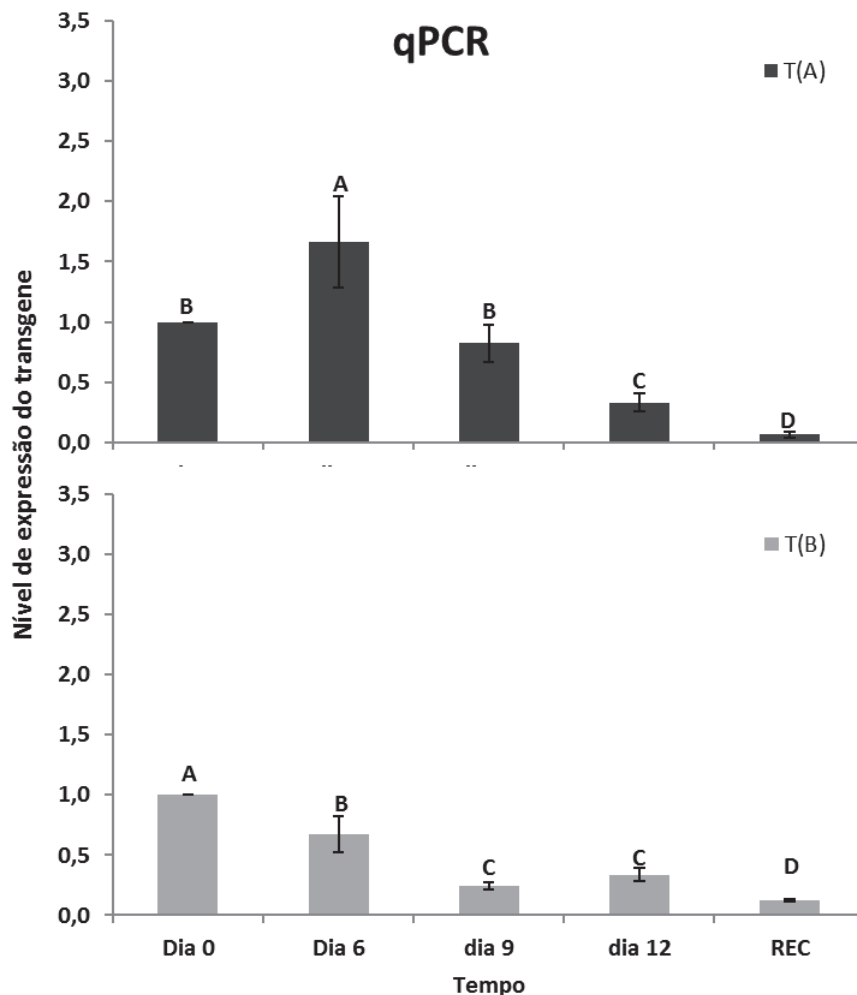


Fig. 13 Análise transcricional do transgene *NPkI* em folhas de plantas de cana-de-açúcar transgênicas, obtidas por agroinfecção T(A) e biobalística T(B), durante o estresse hídrico e após reidratação (REC). A condição normal de cultivo (Dia 0) foi definido como 1 para as análises relativas de expressão. Valores são apresentados pela média \pm SE (n=3). Letras comparam o mesmo evento transgênico entre os dias de estresse. Letras iguais representa não haver diferença significativa entre as médias $P < 0,05$ pelo método de Tukey (5%).

A cascata de MAPK regula positivamente uma rede de transdução de sinais que leva as plantas a tolerar vários estresses ambientais. Para analisar a resposta do gene de tomate *SpMPK3* a estresses abióticos, duas linhagens de tomate foram expostas a 20% de PEG e analisado por RT-PCR quantitativo. Quando as plantas foram sujeitas à solução de PEG houve uma rápida acumulação de transcritos de *SpMPK3* nas 72 h com uma ligeira supressão nas primeiras 12 h. Em tratamentos mais prolongados houve um gradual declínio de transcritos (LI *et al.*, 2014). Este estudo corroboram com os dados obtidos neste trabalho, pois após o 6º dia os eventos transgênicos para *NPKI* tiveram um diminuição de transcritos.

Em trabalhos anteriores de Shou *et al.*, 2004c mostrou que a superexpressão de *NPKI* pode levar à morte de eventos transgênicos. Os eventos de milho transgênicos gerados tiveram baixa expressão do transgene. É provável que as plantas de cana transgênicas de maior expressão, gerados neste estudo não foram capazes de sobreviver. Os eventos que conseguiram sobreviver, podem estar silenciando o transgênico, e outros fatores podem estar atuando tais como a metilação, o rearranjo do DNA, e a estrutura da cromatina e a área de inserção do transgene (DAI *et al.*, 2001). A supressão e a superexpressão de *NPKI* tem demonstrado que têm efeitos prejudiciais na divisão celular, na embriogênese e desenvolvimento de sementes (KOVTON *et al.*, 2000).

O promotor viral *CaMV 35S*, isolado do vírus do mosaico da couve-flor, é um dos mais utilizados para direcionar alto nível de expressão constitutiva em plantas (ODELL *et al.*, 1985). Entretanto, seu funcionamento em monocotiledôneas não é tão eficiente quanto em dicotiledôneas (CHRISTENSEN & QUAIL, 2005), o que pode ter contribuído para a pouca expressão do transgene *NPKI* inserido nas plantas de cana-de-açúcar neste estudo. Porém, observou-se que o *NPKI* sob *CaMV 35S* modificado pode desempenhar um papel importante na via de sinalização de estresse osmótico em plantas de cana transgênica. A proteína NPK1 pode estar envolvida na regulação da transcrição de outros genes relacionados ao estresse, sendo que a expressão de genes responsivos ao estresse osmótico ainda precisa ser investigada.

5.4 CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foi demonstrado que a tolerância ao estresse hídrico na cultura da cana-de-açúcar pode ser melhorada através da expressão constitutiva de um gene MAPKKK de tabaco que ativa a via de sinalização do estresse oxidativo. Os dados mostraram que os eventos transgênicos tiveram melhor desempenho do que as planta controle sob déficit hídrico nas análises de relação hídrica nas folhas, a partir do 6º dia sem irrigação, nas taxas de fotossíntese, condutância estomática e transpiração, a partir do 9º dia. Maior conteúdo de prolina no 6º, 9º e 12º dias e menor dano celular, após 12º dias e na re-hidratação. Mostando que os eventos transgênicos de cana-de-açúcar toleram a seca mais do que a planta controle. O evento transgênico T(B) mostrou melhor desempenho em relação ao evento T(A) nas análises de fotossíntese, prolina e massa seca de raiz. O uso do promotor constitutivo não alterou a análise de biomassa dos eventos transgênicos. Até o momento, este é o primeiro trabalho sobre a expressão de *NPK1* em *Saccharum spp.* A ativação de várias vias de estresse e a acumulação de alguns metabólitos ou antioxidantes em plantas transgênicas pode representar uma nova estratégia de desenvolver plantas que são capazes de sobreviver em condições de estresse por meio de regulação osmótica. O próximo passo deste trabalho seria avaliar o desempenho e crescimento destas plantas transgênicas no campo, quando submetidos a uma combinação de estresses abióticos.

5.5 REFERÊNCIA

- AHN; Y. J.; ZIMMERMAN; J. L. Introduction of the carrot HSP17.7 into potato (*Solanum tuberosum* L.) enhances cellular membrane stability and tuberization in vitro. **Plant, Cell & Environment**. v. 29, p. 95–104, 2006.
- ALTINKUT, A; KAZAN, K; IPEKCI, Z; GOZUKIRMIZI, N. Tolerance to paraquat is correlated with the traits associated with water stress tolerance in segregating F2 populations of barley and wheat. **Euphytica** v. 121, p.281–286, 2001.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**. n.1, v. 24, 1949.
- AUGUSTINE S. M.; NARAYAN J. A.; SYAMALADEVI D. P.; APPUNU C.; CHAKRAVARTHI M.; RAVICHANDRAN V.; TUTEJA N.; SUBRAMONIAN N. Overexpression of EaDREB2 and pyramiding of EaDREB2 with the pea DNA helicase gene (PDH45) enhance drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum spp. hybrid*). **Plant Cell Rep**. v. 34, p. 247–263, 2015a.
- AUGUSTINE S. M.; NARAYAN J. A.; SYAMALADEVI D. P.; APPUNU C.; CHAKRAVARTHI M.; RAVICHANDRAN V.; TUTEJA N.; SUBRAMONIAN N. *Erianthus arundinaceus* HSP70 (EaHSP70) overexpression increases drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum spp. hybrid*). **Plant Science**. v. 232, p. 23–34, 2015b.
- BARBIERI; V.; VILLA NOVA; N. A. **Climatologia e a cana-de-açúcar**. Araras: PLANALSUCAR – Coordenadoria Regional Sul – COSUL. Climatologia; p.1-22, 1977.
- BATES; L. S. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil**. v. 39, p. 205-207, 1973.
- BHUSHAN D.; PANDEY A.; CHOUDHARY M. K.; DATTA A.; CHAKRABORTY S.; CHAKRABORTY N. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress. **Molecular Cell Proteomics**. v. 6, p. 1868–1884, 2007.

BOWER; R.; ELLIOTT; A. R.; POTIER; B. A. M.; BIRCH; R. G. High-efficiency; microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane; using visible or selectable markers. **Molecular Breeding**. v. 2, p. 239–249, 1996.

BRAY; E. A.; BAILEY-SERRES; J.; WERETILNYK; E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN B. B; GRUISSEM. W.; JONES R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists; p. 1158-1203, 2000.

BUTTERFIELD; K.; IRVINE; E.; VALDEZ; G. M.; MIRKOV; E. Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 104, p. 797–803, 2002.

CAI G. H; WANG G. D; WANG L; PAN J. W; LIU Y; LI, D. Q. ZmMKK1, a novel group A mitogen-activated protein kinase gene in maize, conferred chilling stress tolerance and was involved in pathogen defense in transgenic tobacco. **Plant Science**. v. 214, p. 57–73, 2014.

CAMEJO; D.; RODRIGUEZ; P.; MORALES; M. A.; DELLAMICO; J. M.; TORRECILLAS; A.; ALARCON; J. J. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. **Journal Plant Physiology**. v. 162, p. 281–289, 2005.

CARRINGTON, J. C. & FREED, D. D. Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. **Journal of Virology**. v. 64, p. 1590–1597, 1990.

CHANDRA A.; DUBEY A. Effect of ploidy levels on the activities of D-pyrroline-5-carboxylate synthetase; superoxide dismutase and peroxidase in *Cenchrus* species grown under water stress. **Plant Physiology Biochemistry**. v. 48, p. 27–34, 2010.

CHANDRA BABU R.; ZHANG J. X.; BLUM A.; HO D. T. H.; WU R.; NGUYEN H. T. HVA1; a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. **Plant Science**. v. 166, p. 855–862, 2004.

CHARRIER; B.; CHAMPION; A.; HENRY; Y.; KREIS; M. Expression profiling of the whole Arabidopsis shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Plant Physiology**. v. 130, p. 577-590, 2002.

CHEN; N.; LIU; Y.; LIU; X.; CHAI; J.; HU; Z.; GUO; G.; LIU; H. Enhanced tolerance to water deficit and salinity stress in transgenic *Lycium barbarum* L. plants ectopically expressing ATHK1; an *Arabidopsis thaliana* histidine kinase gene. **Plant Molecular Biology Reporter** v. 27, p. 321–333, 2009.

CHENG; M.; LOWE; B. A.; SPENCER; T. M.; YE; X. D.; ARMSTRONG; C. L. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. **In Vitro Cellular and Development Biology Plant**. v. 40, p. 31–45, 2004.

CIA, M. C.; GUIMARÃES, A. C. R.; MEDICI, L. O.; CHABREGAS, S. M.; AZEVEDO R. A. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology** v. 161, p. 313–324, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2014. Cana-de-açúcar tem fechamento da safra 2013/14 e primeira estimativa da 2014/15. <www.conab.gov.br>. Acesso em: nov. 2014.

CUNHA; G. R.; BERGAMASCHI; H. Efeitos da disponibilidade hídrica sobre o rendimento das culturas. In: Bergamaschi; H. (Coord.) **Agrometeorologia aplicada à irrigação**. Porto Alegre; Ed. Universidade – UFRGS; 1992.

DAI, S., ZHENG, P., MARMEY, P., ZHANG, S., TIAN, W.Z., CHEN, S.Y., BEACHY, R.N. AND FAU, C. Comparative Analysis of Transgenic Rice Plants Obtained by *Agrobacterium*-Mediated Transformation and Particle Bombardment. **Molecular Breeding**, v. 7, p. 25-33, 2001.

DILLEWIJN; C. V. Botany of sugarcane. Waltham: **Chronica Botânica**. p. 31, 1952.

DOYLE; J. J.; DOYLE; J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v. 12, p. 13-15,

EL HAFID; R.; SMITH; D. H.; KARROU; M.; SAMIR; K. Physiological attributes associated with early-season drought resistance in spring durum wheat cultivars. **Canadian Journal of Plant Science**. v. 78, p. 227–237, 1998.

EL JAAFARI; S. Durum wheat breeding for abiotic stresses resistance: defining physiological traits and criteria. **Options Mediterranean**. v.40, p. 251–256, 2000.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Structural changes in the sugar market and implications for sugarcane smallholders in developing countries. Disponível em: <www.fao.org/docrep/019/ar714e/ar714e.pdf>. Acesso em: dez. 2014.

FRYE, C. A.; TANG, D.; INNES, R. W. From the cover: negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. **Proceedings of the National Academic of Science USA**. v.98 p. 373–378, 2001.

GASCHO, G. J.; SHIH, S. F. SUGARCANE. In: Teare; I.D.; Peet; M.M. (Ed.). **Crop-Water relations**. New York: John Wiley, p.445-479, 1983.

GORAI, M; ENNAJEH, M; KHEMIRA, H; NEFFATI, M. Combined effect of NaCl-salinity and hypoxia on growth, photosynthesis, waterrelations and solute accumulation in *Phragmites australis* plants. **Flora** v. 205, p.462–470, 2010.

GOUVÊA, J. R. F. Mudanças climáticas e a expectativa de seus impactos na cultura da cana-de-açúcar na região de Piracicaba-SP. **Dissertação de Mestrado**. Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz. Física do Ambiente, Piracicaba, 2008.

GUNASEKERA, D.; BERKOWITZ G. A. Evaluation of contrasting cellular-level acclimation responses to leaf water deficits in three wheat genotypes. **Plant Science**. v. 86, p. 1–12; 1992.

GUPTA, V.; RAGHUVANSHI, S.; GUPTA, A.; SAINI, N.; GAUR, A.; KHAN, M. S.; *et al.* (2010). The water-deficit stress and red-rot-related genes in sugarcane. **Functional & Integrative Genomics**. v. 10, p. 207–214, 2010.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 125 (2), p. 189-198, 1968.

HEMAPRABHA, G.; NAGARAJAN, R.; ALARMELU, S. Evaluation of drought tolerance potential of elite genotypes and progenies of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids). **Sugar Tech** v. 15, p. 9–16, 2013.

HOLMSTRON, K. O.; MANTYLA E.; WELIN, B.; MANDAL, A.; PALVA, E. T.; TUNNELA O. E.; LON-DESBOROUGH J. Drought tolerance in tobacco. **Nature** (Lond.). n. 379, p. 683–684, 1996.

HOTTA, C. T.; LEMBKE, C. G.; DOMINGUES, D. S.; OCHOA, E. A. *et al.* The biotechnology roadmap for sugarcane improvement. **Tropical Plant Biology**. v. 3, n. 2, p. 75–87, 2010.

HSIAO, T. C. Plant response to water stress. **Plant Physiology**. n. 24, p.519-570, 1973.

ICHIMURA K, SHINOZAKI K, TENA G, SHEEN J, HENRY Y, CHAMPION A, ET AL. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. **Trends Plant Science**. v. 7(7), p.301–308, 2002.

INMAN-BAMBER, N. G. *et al.* Increasing sucrose accumulation in sugarcane by manipulating leaf extension and photosynthesis with irrigation. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.59, p.13-26, 2008.

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

INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 6, p. 153–158. 1995.

JIANG, C.-Z.; RODERMEL, S. R.; SHIBLES, R. M. Photosynthesis, Rubisco activity and amount, and their regulation by transcription in senescing soybean leaves. **Plant Physiology**. n. 101, p. 105–112, 1993.

JONAK C.; KIEGERL S.; LIGTERINK W.; BARKER P. J.; HUSKISSON N. S.; HIRT H. Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. **Proceedings of the National Academic of Science USA**. v. 93; p. 11274-9; 1996.

JONAK, C.; ÖKRÉSZ, L.; BÖGRE, L.; HIRT, H. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 5(5), p.415–24, 2002.

KIEBER, J., J.; ROTHENBERG, M.; ROMAN, G.; FELDMANN, K.A.; ECKER, J.R. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinase. **Cell**. v.72, 427–441, 1993.

KONG X. P., PAN J. W., ZHANG M. Y., XING X., ZHOU Y., LIU Y., ET AL. *ZmMKK4*, a novel group C mitogen-activated protein kinase kinase in maize (*Zea mays*), confers salt and cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Cell Environment**. V.34, p.1291–1303, 2011a.

KONG X. P., SUN L. P., ZHOU Y., ZHANG M. Y., LIU Y., PAN J. W., ET AL. *ZmMKK4* regulates osmotic stress through reactive oxygen species scavenging in transgenic tobacco. **Plant Cell Reporter**. v. 30, p. 2097–2104, 2011b.

KONG, X.; LV, W.; ZHANG, D.; JIANG, S.; ZHANG, S.; LI D. Genome-wide identification and analysis of expression profiles of maize mitogen-activated protein kinase kinase kinase. **Plos One**. V. 8(2), p. e57714, 2013.

KOVTUN, Y.; CHIU, W. L.; ZENG W.; SHEEN, J. Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. **Nature**. n. 395, v.6703, p. 716-720, 1998.

KOVTUN, Y.; CHIU, W.-L.; TENA, G.; SHEEN, J. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**. n. 97; p. 2940-2945; 2000.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. Water Relations of Plants and Soils. **Academic Press**. San Diego. p. 495. 1995.

LÁSZLÓ, B. et al. A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. **Plant Cell** v.11, p. 101–113, 1999.

LAWLOR D. W. Genetic engineering to improve plant performance underdrought: physiological evaluation of achievements; limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**. n. 63; p. 695–709, 2013.

LI, R. Y.; QU, R. D. High throughput *Agrobacterium* mediated switchgrass transformation. **Biomass and Bioenergy**. v. 35; p. 1046–1054; 2011.

LIN F., DING H., WANG J., ZHANG H., ZHANG A., ZHANG Y., TAN M., DONG W.; JIANG M. Positive feedback regulation of maize NADPH oxidase by mitogen-activated protein kinase cascade in abscisic acid signalling. **Journal of Experimental Botany** v.60, p. 3221–3238, 2009.

LIU, Y.; ZHANG, D.; WANG, L.; LI D. Genome-wide analysis of mitogen-activated protein kinase gene family in maize. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.31(6), p.1446–60, 2013.

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

LUKOWITZ, W.; ROEDER, A.; PARMENTER, D.; SOMERVILLE, C. A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in Arabidopsis, **Cell**. v. 116, p.109–119, 2004.

MACKOVÁ, H.; MARIE; H.; JANA D.; VERONIKA; T.; ONDREJ; N.; ZUZANA; L.; VÁCLAV; M.; DANIEL; H.; TOMÁS; H.; ILJA; T. P.; ALENA; G.; HELENA; S.; EVA; G.; TOMÁS; W.; THOMAS; S.; RADOMÍRA; V. Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. **Journal Experimental Botany**. v. 64 (10), p. 2805–2815, 2013.

MASON, H. S.; DE WALD, D.; MULLET, J. E. Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean vspB promoter. **Plant Cell**. V.5, p. 241–251, 1993.

MIZOGUCHI T.; IRIE K.; HIRAYAMA T.; HAYASHIDA N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; MATSUMOTO K.; *et al.* A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch; cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**. v. 93, p. 765-9, 1996.

MOLINARI; H. B. C.; MARUR; C. J.; BESPALHOK; J. C.; KOBAYASHI; A. K.; PILEGGI; M.; PEREIRA; F. P. P.; VIEIRA; L. G. E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**: 167, 1375-1381, 2004.

MOMCILOVIC I.; RISTIC Z. Expression of chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu, in two lines of maize with contrasting tolerance to heat stress during early stages of plant development. **Journal Plant Physiology**. v. 164, p. 90–99, 2007.

MURASHIGE; T.; SKOOG; F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v.15, p. 473-479, 1962.

NAGESWARA RAO; R. C.; TALWAR; H.S.; WRIGHT; G. C. Rapid assessment of specific leaf area and leaf nitrogen in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using a chlorophyll meter. **Journal of Agronomy Crop Science**. v. 189, p. 175-182, 2001.

NAKAGAMI, H., KIEGERL, S., HIRT, H. OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction, **Journal of Biology Chemistry**. v. 279 p. 26959–26966, 2004.

NAGY; Z.; TUBA; Z.; ZSOLDOS; F.; ERDEI; L. CO₂ exchange and water relation responses of sorghum and maize during water stress. **Journal Plant Physiol**. v. 145, p. 539–544, 1995.

NING; J.; LI; X.; HICKS; L. M.; XIONG; L. A Raf-like MAPKKK gene DSM1 mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. **Plant Physiology**. v. 152; p. 876-90, 2010.

NISHIHAMA, R.; ISHIKAWA, M. ; ARAKI, S.; SOYANO, T.; ASADA, T.; MACHIDA, Y. The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis, **Genes & Development**. v. 15, p. 352–363, 2001.

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N.-H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**. London, v. 313, p. 810-812, 1985.

OLSSON; M. Alterations in lipid composition, lipid peroxidation and anti-oxidative protection during senescence in drought stressed plants and non-drought stressed plants of *Pisum sativum*. **Plant Physiology Biochemistry**. n. 33, p. 547–553, 1995.

OMETO; J. C. Parâmetros meteorológicos e a cultura da cana-de-açúcar. Piracicaba: ESALQ; p.17, 1980.

PATADE; V. Y.; RAI; A. N.; SUPRASANNA; P. Expression analysis of sugarcane shaggylike kinase (SuSK) gene identified through cDNA subtractive hybridization in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Protoplasma**. v. 248, p. 613-621, 2011.

PENG; L. X.; GU; L. K.; ZHENG; C. C.; LI; D. Q.; SHU; H. R. Expression of MaMAPK gene in seedlings of *Malus* L. under water stress. **Acta Biochimica Biophysica Sinica (Shanghai)**. v. 38,p.281-286, 2006).

PINHEIRO; H. A.; DA MATTA F. M.; CHAVES; A. R. M.; LOUREIRO; M. E.; DUCATTI; C. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**. v. 96, p.101–108, 2005.

RAMAKERS C, RUIJTER J. M, DEPRez R. H, MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**. v. 339, p.62–66, 2003.

RAO, K. P.; RICHA, T.; KUMAR, K.; RAGHURAM, B.; SINHA, A. K. In silico analysis reveals 75 members of mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family in rice. **DNA Research**. V. 17(3), p.139–53, 2010.

REIS, R. R.; CUNHA, B. A. D. B-D.; MARTINS, P. K.; MARTINS, M. T. B.; ALEKCEVETCH J. C.; CHALFUN-JÚNIOR A.; ANDRADE A. C.; RIBEIRO A. P.; QIN F.; MIZOI J.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; NAKASHIMAD K.; CARVALHO, J. F. C.; DE SOUSA C. A. F.; NEPOMUCENO A. L.; KOBAYASHIA, A. K.; MOLINARI, H. B. C. Induced over-expression of AtDREB2A CA improves drought tolerance in sugarcane. **Plant Science**. v. 221–222, p. 59–68, 2014.

RFA - RENEWABLE FUELS ASSOCIATION - World Fuel Ethanol Production. Disponível em <www.ethanolrfa.org>. Acesso em: dez. 2014.

RICHARDS, R. A. Defining selection criteria to improve yield under drought. **Plant Growth Regulation**. v. 20, p. 157–166, 1996.

RITCHIE, S.W.; NGUYAN H.T.; HOLADAY A.S. Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. **Crop Science**. v. 30, p. 105–111, 1990.

ROHILA, J. S.; YANG, Y. Rice mitogen-activated protein kinase gene family and its role in biotic and abiotic stress response. **Journal of Integrative Plant Biology**. V. 49(6), p.751–759, 2007.

SANTOS, C. M.; SILVA M. DE A. Physiological and biochemical responses of sugarcane to oxidative stress induced by water deficit and paraquat. **Acta Physiology Plantarum**. v.37, p.172, 2015.

SCHAEFFER, H. J.; WEBER M. J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. **Molecular Cell Biology**. v. 19, p. 2435–44, 1999.

SEKI; M.; KAMEI; A.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; K.; SHINOZAKI; K. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Current Opinion Biotechnology**. v.14, p.194-199, 2003.

SHOU, H., FRAME, B., WHITHAM, S., WANG, K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. **Molecular Breeding**. v.13, p.201-208, 2004c.

SHOU, H.; BORDALLO, P.; FAN, J-B.; YEAKLEY, J. M.; BIBIKOVA M.; SHEEN J.; WANG K. From The Cover: Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize. **PNAS**. v.101, p. 3298-3303, 2004b.

SHOU, H.; BORDALLO, P.; WANG, K. J. Expression of the *Nicotiana* protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. **Journal of Experimental Botany**. v. 55, p. 1013-1019, 2004a.

SHRAWAT; A. K.; LORZ; H. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: A promising approach crossing barriers. **Plant Biotechnology Journal**. v. 4, p. 575–603, 2006.

SOOD, A.; PABBIB, S.; UNİYALA, P. L. Effects of paraquat on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in aquatic fern *Azolla microphylla*. **Journal Plant Physiology**. v. 58, p.667–673, 2011.

SUPRASANNA, P.; PATADE, V. Y.; DESAI, N. S.; DEVARUMATH, R. M.; KAWAR, P. G.; PAGARIYA, M. C.; *et al.* Biotechnological Developments in Sugarcane Improvement: An Overview. **Sugar Technology**. v. 13, p. 322–335, 2011.

TENA G.; ASAI T.; CHIU W-L.; SHEEN J. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. **Current Opinion Plant Biology**. v. 4(5), p. 392–400, 2001.

TIEL, K.; A ENRÍQUEZ, G.; CEBALLO, Y.; SOTO, N.; D FUENTES, A.; FERREIRA, A.; COLL, Y.; PUJOL, M. Development of a system for rapid plant regeneration from in vitro

sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) meristematic tissue. **Biotecnología aplicada**. v. 23, p. 22-24, 2006.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. 2014 - UNICA espera mudanças em relação à política energética do governo e interlocução direta com a presidenta Dilma. <www.unica.com.br>. Acesso em: nov. 2014.

WALID F. M.; WU H.; YUAN X.; CODY S.; SURINDER K. S.; FREDY A. Generation of Transgenic Energy Cane Plants with Integration of Minimal Transgene Expression Cassette. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, N. 5, p. 407-413, 2015.

WANG, J.; DING, H.; ZHANG, A.; MA, F.; CAO, J.; JIANG, M. A novel mitogen-activated protein kinase gene in maize (*Zea mays*), ZmMPK3, is involved in response to diverse environmental cues. **Journal of Integrative Plant Biology**. v.52, p. 442-52, 2010.

WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant community. **Plant Cell and Environment**. v. 33, p. 510–525, 2010.

WU H.; AWAN F. S.; VILARINHO A.; ZENG Q.; KANNAN B.; PHIPPS T.; MCCUISTON J.; WANG W.; CAFFALL K.; ALTPETER F. Transgene integration complexity and expression stability following biolistic or *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** p. 1-9.

XING Y., JIA W. & ZHANG J. AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany** v. 58, p. 2969–2981, 2007.

XING Y., JIA W. & ZHANG J. AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. **The Plant Journal** v. 54, p. 440–451, 2008.

XIONG, L.; YANG, Y. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. **Plant Cell**. v. 15, p. 745-59, 2003.

XIONG, L.; ZHU, J.-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell & Environment**. v.25, p.131-139, 2002.

YOOYONGWECH S.; CHA S.; SUPAIBULWATANA K. Water relation and aquaporin genes (PIP 1-2 and PIP2-1) expression at the reproductive stage of rice (*Oryza sativa* L. spp. indica) mutant subjected to water deficit stress. **Plant Omics Journal** v. 6, p. 79–85, 2013.

ZHANG A., JIANG M., ZHANG J., TAN M. & HU X. Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. **Plant Physiology** v. 141, p. 475–487, 2006.

ZHANG X.; CHENG T.; WANG G.; YAN Y.; XIA Q. Cloning and evolutionary analysis of tobacco MAPK gene family. **Molecular Biology Reporter**. v. 40, p. 1407–1415, 2013.

ZHANGSUN, D.; LUO, S.; CHEN, R.; TANG, K. Improved *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of GNA transgenic sugarcane. **Section Cellular and Molecular Biology**. v. 62. 386-393, 2007.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**. v. 53, p. 247-73, 2002.

ZONG X.J., LI D.P., GU L.K., LI D.Q., LIU L.X. & HU X.L. Abscisic acid and hydrogen peroxide induce a novel maize group C MAP kinase gene, *ZmMPK7*, which is responsible for the removal of reactive oxygen species. **Planta** v. 229, p. 485–495, 2009.

ZONG, X. J; LI, D. P; GU, L. K; LI, D. Q; LIU, L. X; HU, X. L. Abscisic acid and hydrogen peroxide induce a novel maize group C MAP kinase gene, *ZmMPK7*, which is responsible for the removal of reactive oxygen species. **Planta**. v.229, p.485–95, 2009.