

## Identificação de Genes Diferencialmente Expressos sob Condições de Déficit Hídrico em Genótipos de Cana-de-açúcar

Cássia Ângela Pedrozo<sup>1</sup>; John L. Jifon<sup>2</sup>; Márcio Henrique Pereira Barbosa<sup>3</sup>; Jorge Alberto da Silva<sup>4</sup>; Jong-Won Park<sup>5</sup>; Nora Solis Gracia<sup>6</sup>

### Resumo

Este estudo teve como objetivo identificar genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico, em dois genótipos de cana-de-açúcar (TSP05-4: tolerante à seca e TCP02-4589: sensível à seca). Os genótipos foram submetidos a dois tratamentos hídricos (déficit hídrico moderado e boas condições hídricas), e avaliados em três diferentes estágios: aos dois e aos 12 dias após o início do déficit hídrico (T1 e T2, respectivamente) e, também, após oito dias de re-irrigação (T3). Um total de 13 fragmentos de derivados de transcritos (TDFs) diferencialmente expressos foi sequenciado e caracterizado. Três TDFs mostrando similaridade com genes que codificam para um pentatricopeptídeo putativo, para um transportador glicose-6-fosfato/fosfato 2 e para uma subunidade regulatória CK2•3 da proteína quinase CK2 foram diferencialmente expressos no genótipo TCP02-4589. Os dois primeiros TDFs foram reprimidos enquanto que o último foi induzido. Um TDF similar a uma proteína induzida pela seca em cana-de-açúcar foi também induzido no genótipo TSP05-4. Todos os TDFs regulados pelo déficit hídrico tiveram seu padrão normal de expressão restaurado após o período de re-irrigação, indicando que a magnitude e a duração do déficit hídrico não foram severos o bastante para dificultar a capacidade de recuperação da expressão gênica.

### Introdução

Em muitas regiões do mundo, a seca é o principal fator limitante à produção de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), sendo causada por períodos de déficit hídrico prolongados ou por irrigação inadequada (Inman-Bamber e Smith, 2005). Esta condição de stress induz a uma variedade de respostas negativas nas plantas, desde alteração na expressão genica até alteração no desenvolvimento e na produtividade final da cultura.

A tolerância ao déficit hídrico é uma característica poligênica e, portanto, difícil de ser trabalhada pelo melhoramento tradicional. Sendo assim, a identificação e a caracterização de genes regulados pelo déficit hídrico se torna essencial para o entendimento dos mecanismos de tolerância/sensibilidade e para o consequente desenvolvimento de cultivares tolerantes, seja pela transgenia, seja pelo melhoramento assistido por marcadores moleculares.

Estudos com o objetivo de detectar genes regulados por condições de déficit hídrico em cana-de-açúcar foram realizados usando as técnicas de macroarranjos e de microarranjos (Rocha *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009). Nestes estudos, genes codificando para transportadores, fatores de transcrição, proteínas quinases, proteínas fosfatases e enzimas de biossíntese de auxinas foram encontrados. Apesar dessas informações iniciais, pouco ainda se sabe a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na tolerância/sensibilidade ao déficit hídrico na cultura.

O objetivo deste estudo foi utilizar a técnica de cDNA-AFLP para identificar genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico moderado, em dois genótipos de cana-de-açúcar.

### Material e Métodos

O presente estudo foi realizado durante no ano de 2009, na Agrilife Research and Extension Center (26° 25'N, 97° 9'W, 29 m de elevação), em Weslaco, Texas, Estados Unidos. Dois genótipos de cana-de-açúcar, os quais são fenotipicamente classificados como tolerante (TSP05-4) e sensível ao déficit hídrico (TCP02-4589),

<sup>1</sup> Pesquisadora Embrapa Roraima, Rodovia BR-174, km 8, Distrito Industrial, CEP: 69301-970, Boa Vista, RR. E-mail: cassia@cpafrr.embrapa.br

<sup>2</sup> Professor da Texas A&M University, Texas Agrilife Research, 2415 E Highway 83, 78596, Weslaco, Texas, Estados Unidos. E-mail: jifon@tamu.edu

<sup>3</sup> Professor Associado do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, CEP: 36570-000, Viçosa, MG. E-mail: barbosa@ufv.br

<sup>4</sup> Professor da Texas A&M University, Texas Agrilife Research, 2415 E Highway 83, 78596, Weslaco, Texas, Estados Unidos. E-mail: jadasilva@ag.tamu.edu

<sup>5</sup> Bolsista de Pós-doutorado, Texas A&M University, Texas Agrilife Research, 2415 E Highway 83, 78596, Weslaco, Texas, Estados Unidos. E-mail: jwpark@ag.tamu.edu

<sup>6</sup> Assistente, Texas A&M University, Texas Agrilife Research, 2415 E Highway 83, 78596, Weslaco, Texas, Estados Unidos. E-mail: ngracia@ag.tamu.edu

foram avaliados. Segmentos nodais foram germinados em bandejas de plástico contendo substrato MetroMix (MetroMix MM200, Scotts-Sierra Horticultural Products Co, Marysville, OH) e duas semanas após a germinação, plântulas uniformes foram transplantadas para potes de 15 L contendo o mesmo substrato. Até o 69º dia após o plantio (DAP) as plantas foram diariamente irrigadas e periodicamente fertilizadas.

No 70º DAP, as plantas de cada genótipo foram aleatoriamente divididas em dois grupos para imposição de dois tratamentos hídricos. O primeiro grupo de plantas foi submetido ao regime de déficit hídrico, onde a umidade volumétrica do solo foi mantida a aproximadamente 15 %, enquanto que, o segundo grupo permaneceu sob boas condições hídricas, com umidade volumétrica do solo de aproximadamente 35 %. Para cada genótipo e tratamento hídrico foram utilizados três vasos com uma planta cada, resultando em um total de 12 vasos. O conteúdo de umidade do solo foi diariamente monitorado por meio de sensores de umidade (EC5, Decagon Devices, Inc). Os tratamentos hídricos foram mantidos até 90º DAP.

Amostras de tecido foliar de todas as plantas foram coletadas em três diferentes estágios: aos dois e aos 12 dias após o início do déficit hídrico (T1 e T2, respectivamente) e, posteriormente, após oito dias de re-irrigação das plantas (T3). A extração de RNA total e o isolamento de RNA Poli (A)<sup>+</sup> foram realizadas utilizando-se, respectivamente, os kits QIAGEN Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) e o MicroPoly(A) Purist™ Kit (Ambion). As fitas simples e duplas de cDNA foram sintetizadas por meio do SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis (Invitrogen).

A análise de cDNA-AFLP foi realizada por meio do kit AFLP® Expression Analysis (LI-COR, Lincoln, NE), utilizando-se as enzimas *TaqI* e *MseI* e um total de 22 primers obtidos pela combinação de *MseI*+2 e *TaqI*+2. Os primers seletivos *TaqI*+2 foram marcados com os corantes IRDye 700 e IRDye 800 (LI-COR). Os produtos obtidos da amplificação seletiva foram resolvidos em eletroforese de gel de poliacrilamida 6,5 %, em um analisador de DNA (modelo 4300 LI-COR®). As imagens dos fragmentos derivados de transcritos (TDFs) foram coletadas pelo software de análise de imagens LI-COR's Saga e aqueles diferencialmente expressos (TDFs) sob condições de déficit hídrico foram selecionados.

Um total de 13 TDFs diferencialmente expressos foi selecionado, purificado por meio do kit Zymoclean™ Gel DNA recovery (Zymo Research), clonado no pGEM®-T Easy vector (Promega Corp., Madison, WI) e usado para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5•. Posteriormente, os plasmídeos recombinantes foram isolados usando o kit Zyppy™ plasmid Miniprep (Zymo Research) e sequenciados usando um sequenciador de DNA automatizado (Applied Biosystem, Inc.). As sequências dos nucleotídeos, bem como das sequências traduzidas foram comparadas às sequências disponíveis no GenBank.

## Resultados e Discussão

Cerca de 1550 TDFs, variando de aproximadamente 50 a 500 pb foram detectados e, dentre estes, 30 foram classificados como diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico. Deste número total de TDFs diferencialmente expressos, 24 foram induzidos e seis foram reprimidos. Vinte e três TDFs foram detectados exclusivamente no genótipo TCP02-4589, enquanto que, seis foram detectados exclusivamente no TSP05-4. Apenas um TDF foi detectado simultaneamente em ambos os genótipos. Pelo maior número de TDFs diferencialmente expressos no genótipo TCP02-4589, pode-se afirmar que a resposta ao déficit hídrico foi detectada mais precocemente neste genótipo, fato que também foi observado para outros genótipos de cana-de-açúcar sensitivos ao déficit hídrico (Rodrigues et al., 2009).

**Tabela 1.** Classificação funcional de fragmentos derivados de transcritos (TDFs) diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico, em dois genótipos de cana-de-açúcar (TSP05-4: T e TCP02-4589: S), avaliados aos dois e aos 12 dias após início de déficit hídrico moderado (T1 e T2, respectivamente).

Acesso no GenBank	pb	Homologia da Sequência	E-Value	Tipo*	G	EA
JG014679	201	Putative expressed pentatricopeptide, <i>Oriza sativa</i> (ABA99065.2)	$1.0 e^{-27}$	R	S	T1, T2
JG014680	247	Hypothetical protein OsJ-08616, <i>Oriza sativa</i> (EEE57919.1)	$2.0 e^{-40}$	R	S	T1, T2
JG014681	112	Sem similaridade significativa	-	R	S	T1
JG014675	84	22 kDA drought-inducible protein mRNA, <i>Saccharum</i> hybrid cultivar (AY496271.1)	$3.0 e^{-33}$	I	T	T2
JG014676	93	Hypothetical protein OsI-08927, <i>Oriza sativa</i> (EEC74003.1)	$2.0 e^{-07}$	R	T	T2

JG014682	264	Protein quinase CK2 regulatory subunit CK2•3, <i>Zea mays</i> (NM001111505.1)	$2.0 e^{-79}$	I	S	T2
JG014683	217	Sem similaridade significativa	$1.0 e^{-19}$	I	S	T2
JG014677	111	Sem similaridade significativa	-	R	T	T1
JG014684	143	Hypothetical protein LOC100273728, <i>Zea mays</i> (NP001141610.1)	$1.0 e^{-19}$	R	S	T1, T2
JG014685	281	Sem similaridade significativa	-	R	S	T1, T2
JG014686	282	Glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2, <i>Zea mays</i> (NP001147439.1)	$1.0 e^{-21}$	R	S	T2
JG014687	343	Putative tocopherol polyprenyltransferase, <i>Oryza sativa</i> (BAC83059.1)	$5.0 e^{-52}$	I	S	T2
JG014678	131	Sem similaridade significativa	-	R	S,T	T1

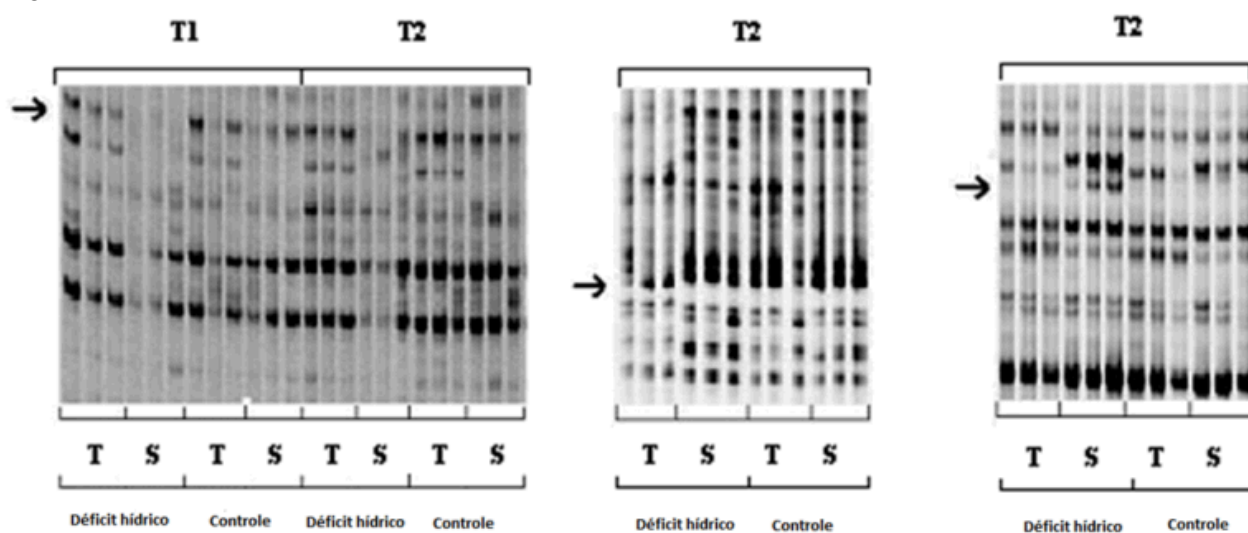
G: genótipo; EA: estágio de avaliação que o TDF foi diferencialmente expresso

\* Classificação dos TDFs quanto ao padrão de expressão (indução: I e repressão: R)

Um total de 11 TDFs foram detectados exclusivamente no estágio de avaliação T1, enquanto que, oito foram detectados exclusivamente no estágio T2. Por outro lado, 11 TDFs foram detectados tanto em T1 quanto em T2. Em ambos os genótipos avaliados, todos os TDFs regulados pelo déficit hídrico tiveram seu padrão normal de expressão restaurado após o período de re-irrigação (estágio T3), indicando que a magnitude e a duração do déficit hídrico não foram severos o bastante para dificultar a capacidade de recuperação da expressão gênica.

As características de 13 TDFs, os quais foram sequenciados, são descritas na Tabela 1. Cinco TDFs mostraram similaridade significativa com genes de função putativa ou conhecida, três mostraram similaridade à proteínas hipotéticas e cinco não mostraram similaridade a nenhuma sequência presente no GenBank. Os TDFs caracterizados foram similares a sequências descritas para arroz, milho e cana-de-açúcar.

Os TDFs nomeados JG014679, JG014675, JG014682, JG014686 e JG014687 revelaram similaridade a genes que respondem a condições de seca, frio e salinidade. Três desses TDFs, os quais mostraram similaridade a genes que codificam para um pentatricopeptídeo putativo (JG014679), para um transportador glicose-6-fosfato/fosfato 2 (JG014686) e para uma subunidade regulatória CK2•3 da proteína quinase CK2 (JG014682), foram diferencialmente expressos no genótipo TCP02-4589. Os dois primeiros TDFs foram reprimidos, enquanto que, o último foi induzido. As imagens dos TDFs JG014679, JG014675 e JG014682 são mostradas na Figura 1.



**Figura 1.** Fragmentos derivados de transcritos (TDFs) diferencialmente expressos (A: JG014679; B: JG014675; e C: JG014682) sob condições de déficit hídrico moderado, em dois genótipos de cana-de-açúcar (TSP05-4: T e TCP02-4589: S), avaliados em dois estágios de avaliação (T1 e T2: dois e 12 dias após início de déficit hídrico moderado, respectivamente).

Proteínas contendo repetições pentatricopeptídeos (proteínas PPRs) são envolvidas no desenvolvimento das plantas, na biossíntese de organelas, na restauração da machoesterilidade citoplasmática, no processamento e edição de RNA organelares e, também, em resposta a stresses ambientais (Meierhoff et al., 2003; Lurin et al., 2004; Schmitz-Linneweber e Small, 2008; Rodrigues et al., 2009). De forma semelhante ao observado no presente estudo, dois TDFs que apresentaram similaridade a proteínas PPR foram também observados em outros genótipos de cana-de-açúcar expostos ao déficit hídrico (Rodrigues et al., 2009).

Uma das funções do transportador glicose-6-fosfato/fosfato é importar glicose-6-fosfato em amiloplastos para que este seja utilizado como precursor na biossíntese de amido e de ácido fático (Fischer e Weber, 2002). De acordo com alguns estudos (Qin et al., 2008; Xue et al., 2008; Lee et al., 2010), condições de seca, calor e frio causaram reduções significativas nos níveis de expressão de genes de transportadores de glicose-6-fosfato/fosfato cloroplastidiais em trigo e em arábido.opsis.

Em plantas, as proteínas quinases CK2 são envolvidas em muitos processos, incluindo transcrição de DNA, tradução de RNA e regulação do ciclo celular (Riera et al., 2001; Espunya et al., 2005). No entanto, este é o primeiro relato a respeito da regulação de uma subunidade de quinase CK2 por condições de déficit hídrico.

O TDF nomeado JG014675 foi levemente induzido no genótipo TSP05-4 e mostrou similaridade a uma proteína (SoDip22), também induzida pela seca em cana-de-açúcar (Sugiharto et al., 2002). Acredita-se que, SoDip22 pertença a uma família de proteínas induzidas por condições de stress.

## Conclusões

Os resultados encontrados neste estudo podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de marcadores moleculares a serem utilizados na seleção assistida para tolerância a condições de déficit hídrico e, conseqüentemente, no melhoramento da produção de cana-de-açúcar em áreas de limitada disponibilidade hídrica.

## Referências

Inman-Bamber NG and Smith DM (2005) Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research** 92: 185-202.

Espunya MC, López-Giráldez T, Hernan I, Carballo M and Martínez MC (2005) Differential expression of genes encoding protein kinase CK2 subunits in the plant cell cycle. **Journal of Experimental Botany** 56 (422): 3183-3192.

Fischer K and Weber A (2002) Transport of carbon in non-green plastids. **Trends in Plant Science**;7p.

Lee J, Joo H, Choy Y, Ha-Lee Y and Lee D (2010) Using specialized cDNA microarrays to analyse Arabidopsis gene expression under cold stress. **Journal of Plant Biology** 53: 240-50.

Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, et al (2004) Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. **The Plant Cell** 16:2089-2103.

Meierhoff KF, Nakamura T, Bechtold N and Schuster G (2003) HCF152, an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. **The Plant Cell** 15: 1480-1495.

Qin D, Wu H, Peng H, Yao Y, Ni Z, Li Z, et al (2008) Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat sensitive and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using wheat genome array. **BMC Genomics** 9 (942): 19p.

Riera M, Peracchia G and Pagès M (2001) Distinctive features of plant protein kinase CK2. **Molecular and Cellular Biochemistry** 227: 119-127.

Rocha FR, Papini-Terzi FS, Nishiyama Jr MY, Vêncio RZN, Vicentini R, et al (2007) Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics** 8 (71): 1-22.

Rodrigues FA, Laia ML and Zingaretti SM (2009) Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. **Plant science** 176: 286-302.

Schmitz-Linneweber C and Small I (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. **Trends in Plant Science** 13 (12): 663-670.

Sugiharto B, Ermawati N, Mori H, Aoki K, Yonekura-Sakakibara K, Yamaya T, et al (2002) Identification and characterization of a gene encoding drought-inducible protein localizing in the bundle sheath cell of sugarcane. **Plant Cell Physiology** 43 (3): 350-4.

Xue G, McIntyre CL, Glassop D and Shorter R (2008) Use of expressing analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. **Plant Molecular Biology** 67: 197-214