



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATHALIA GERALDO BELINTANI

**“EXPRESSÃO DO GENE DA ISOPENTENILTRANSFERASE
(IPT) SOB CONTROLE DE PROMOTOR FRIO INDUZIDO EM
CANA-DE-AÇÚCAR”**

NATHALIA GERALDO BELINTANI

**“EXPRESSÃO DO GENE DA ISOPENTENILTRANSFERASE
(IPT) SOB CONTROLE DE PROMOTOR FRIO INDUZIDO EM
CANA-DE-AÇÚCAR”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira.

Londrina
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B431e Belintani, Nathalia Geraldo.

Expressão do gene da isopenteniltransferase (ipt) sob controle de promotor frio induzido em cana-de-açúcar / Nathalia Geraldo Belintani. – Londrina, 2010. vii, 80 f. : il.

Orientador: Luiz Gonzaga Esteves Vieira.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2010. Inclui bibliografia.

1. Cana-de-açúcar – Melhoramento genético – Teses. 2. Cana-de-açúcar – Engenharia genética – Teses. 3. Genética – Expressão – Teses. 4. Plantas – Efeito do frio – Teses. 5. Plantas transgênicas – Teses. I. Vieira, Luiz Gonzaga Esteves. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas.

NATHALIA GERALDO BELINTANI

**“EXPRESSÃO DO GENE DA ISOPENTENILTRANSFERASE (IPT)
SOB CONTROLE DE PROMOTOR FRIO INDUZIDO EM CANA-DE-
AÇÚCAR”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira
Embrapa Café/UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Anderson Rotter Meda
Syngenta Seeds

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira
IAPAR/UEL – Londrina - PR

Londrina, 23 de fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

À minha família: ausentes, presentes e futuros.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira (Santista), pela oportunidade de estágio, orientação e conhecimentos compartilhados ao longo desses quatro anos de convivência, fundamentais para minha formação profissional;

À banca examinadora, Dr. Luiz Filipe P. Pereira e Dr. Anderson R. Meda, pelo apoio, sugestões e considerações fundamentais para o aprimoramento deste trabalho;

Ao Dr. Celso Jamil Marur, pelo comprometimento e auxílio durante a condução do experimento em câmara de crescimento;

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno e ao Dr. Eduardo F. Carlos pela disponibilidade e importantes considerações feitas;

À Universidade Estadual de Londrina e a todos os docentes que contribuíram para minha formação acadêmica;

Ao Instituto Agrônomo do Paraná pela oportunidade de realização deste trabalho;

Ao Programa de Genética e Biologia Molecular – coordenação, docentes, e à Sueli M. Trindade, sempre atenciosa com os trâmites burocráticos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa;

À professora Dra. Rosângela e Julia, pelo companheirismo, cumplicidade e ensinamentos durante todos os momentos deste trabalho – obrigada por tudo!

A todos os amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, presentes ou que por ali já passaram (em especial à Gislaine, Sandra e Tiago), pelas conversas e conselhos;

A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos do IAPAR, pela convivência agradável e primeiros ensinamentos (Sueli, Fátima, Lucinéia, Cícera);

Ao Sr. João, sempre de prontidão, pelo cuidado e carinho com as plantas;

Aos grandes amigos, que mesmo distante se fazem sempre presentes;

Aos meus pais, Wander e Ana Maria: pelo amor, incentivo e apoio incondicionais, pelas sábias palavras - meus grandes exemplos de vida;

À minha irmã, Marina, pela convivência durante todo o mestrado (ou quase todo): pelos conselhos, carinho, amizade despretenciosa - saudades do convívio diário;

Ao meu namorado e maior companheiro, Lucas Gorla, pelo carinho, compreensão e paciência, principalmente nos últimos meses, e por tornar-me sempre mais feliz;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho; meus sinceros agradecimentos.

BELINTANI, Nathalia Geraldo. **“Expressão do gene da Isopenteniltransferase (IPT) sob controle de promotor frio induzido em cana-de-açúcar.** 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, 2010, Londrina,2010.

RESUMO

A habilidade de resistir a baixas temperaturas e ao resfriamento é um fator determinante para a distribuição geográfica e para a produtividade de culturas agrícolas. Mesmo em áreas consideradas adequadas para o cultivo de dada cultivar ou espécie, freqüentemente ocorre diminuição do rendimento e a quebra de safra em resposta às temperaturas de congelamento. A cana-de-açúcar é uma cultura sensível ao frio, e apesar de ocupar regiões tropicais e subtropicais onde geadas não são comuns, quando ocorrem, há quebras de safra e redução da qualidade das plantas. Características como elevada ploidia, reduzida fertilidade, tamanho e complexidade do genoma, e interações complexas com o meio, tornam o melhoramento genético convencional laborioso para esta cultura. Atualmente, as técnicas de biotecnologia podem oferecer alternativas para a redução do tempo de obtenção de novos genótipos. Entre essas técnicas está a produção de plantas transgênicas, que abre novas perspectivas ao melhoramento convencional, permitindo a rápida incorporação de características desejáveis às espécies perenes. Portanto, a geração de variedades resistentes a estresses por meio da engenharia genética é uma das principais ferramentas para o melhoramento na produção de cana-de-açúcar. Os objetivos do presente trabalho foram 1) transformar plantas de cana-de-açúcar com o gene *ipt*, de *Agrobacterium tumefaciens*, que codifica a enzima isopenteniltransferase, catalizadora do primeiro passo da biossíntese de citocininas em plantas, sob controle do promotor frio induzido COR15a de *Arabidopsis thaliana*; e 2) avaliar a resposta ao estresse de baixas temperaturas das plantas transformadas. Para isto, foram obtidos eventos de transformação por biobalística da variedade RB855536, por co-transformação com o plasmídeo pEmuKn, contendo o gene marcador de seleção *nptII* fusionado ao promotor Emu, de elevada expressão em monocotiledôneas. Foram obtidos 15 eventos co-transformados, confirmados via PCR. Destes, três eventos de transformação foram utilizados em experimentos para avaliação de senescência provocada por frio em folhas destacadas. Neste experimento, os eventos de transformação apresentaram níveis mais elevados de clorofila total nos tratamentos, comparados à planta controle não transformada, com visível redução da senescência. Em ensaio de tolerância ao frio em câmara de crescimento com plantas, quatro eventos foram escolhidos para verificar tolerância ao frio. O conteúdo de clorofila total dos segmentos foliares dos eventos transgênicos foi de 23 a 31% superior do que nas plantas controle após temperatura de congelamento. O nível de MDA nas plantas controle chegou a ser 55% mais elevado do que o evento transformado com o maior nível de peroxidação lipídica, após as temperaturas de resfriamento e congelamento. Nas análises de condutividade elétrica, as plantas controle apresentaram maiores danos na membrana celular. A expressão do gene *ipt* foi verificada via RT-PCR semiquantitativa com o gene normalizador *gapdh*, e a razão de expressão *ipt/gapdh* chegou a ser maior após o estresse, comparado ao início do ensaio. Os resultados

do trabalho indicam o aumento de tolerância ao frio das plantas transgênicas de cana-de-açúcar com inserção do cassete COR15a:ipt.

Palavras-chave: Saccharum spp. Isopenteniltransferase. COR15a. Estresse de frio Senescência.

BELINTANI, Nathalia Geraldo. “**Gene expression Isopenteniltransferase (IPT) under the control of cold-induced promoter in cana sugar**. 96f. Dissertação (Master’s degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, 2010, Londrina,2010.

ABSTRACT

The ability to withstand low temperatures is a determining factor for the distribution geographical and productivity of agricultural crops. Even in areas considered suitable for the cultivation of a given cultivar or specie, often occurs reduced yields and crop failure in response to freezing temperatures. Sugarcane is generally considered as a cold-sensitive plant and despite occupy the tropics and subtropics where frost is not common, when it occurs there are crop failures and reduced quality of the plants. High ploidy, poor fertility, size and complexity of the genome, and complex interactions with the environment, make sugarcane a good candidate for molecular breeding. Biotechnology techniques can offer alternatives for reducing the time to obtain new genotypes. Among these techniques the production of transgenic plants opens new perspectives to conventional breeding, allowing the rapid incorporation of desirable characteristics for perennial species. The generation of stress-resistant varieties by genetic engineering is one of the main tools for improvement sugarcane production. This work aimed to 1) transform sugarcane with the ipt gene (*Agrobacterium tumefaciens*) that encodes the enzyme isopenteniltransferase, catalysing the first step in biosynthesis of cytokinins in plants, under control of a cold inducible gene promoter COR15a (*Arabidopsis thaliana*) and 2) evaluate the response of of these transgenic plants to low temperatures stress. For this, events were obtained by biolistic transformation of sugarcane variety RB855536 by co-transformation with the plasmid pEmuKn containing the selection marker gene nptII fused to the highly expressed monocot promoter Emu. Fifteen transgenic events were regenerated and confirmed via PCR. The analysis of three transformation events used in experiments to evaluate senescence induced by cold in detached leaves showed higher levels of chlorophyll in transformed events than the control plant, with visible reduction of leaf senescence. Four events were chosen to verify cold tolerance of grown sugarcane plants in a growth chamber,. The total chlorophyll content of leaf segments of transgenic events was 23 to 31% higher than in control plants after freezing temperature. The MDA level in control plants were 55% higher than the transgenic plant with the highest level of lipid peroxidation after chilling and freezing temperatures. In electrical conductivity analysis, the control plants showed greater damage to the cell membrane. The expression of the ipt gene was detected via semiquantitative RT-PCR using GAPDH as the normalizer gene. The ipt/GAPDH expression ratio was higher after cold stress compared to that was detected in the plants at the beginning of the experiment. Altogether, these results indicate the increased cold tolerance of the COR15a:ipt transgenic sugarcane.

Keywords: *Saccharum* spp. Isopenteniltransferase. COR15a. Cold stress. Senescence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Alterações fisiológicas e bioquímicas das plantas em resposta a Temperaturas de resfriamento. Algumas alterações são comumente observadas quando plantas são submetidas a baixas temperaturas, não congelantes (adaptado de Xin e Browse, 2000).....26
- Figura 2** Modelo do papel dos açúcares, atuantes na sinalização para regulação da senescência foliar (Adaptado de Wingler et al., 2005).....33
- Figura 3** Reações primárias da biossíntese de citocininas catalizadas por IPT e tRNA-IPT (Sakakibara, 2005).....35
- Figura 4** Nomes e estruturas de citocininas que ocorrem naturalmente. Sítio de conjugação R1 com anel de adenina representado por asterisco (Sakakibara, 2004)36
- Figura 5** Diferentes formas isoméricas da zeatina.....36
- Figura 6** Esquema do cassete inserido no vetor pBluescript II Ks (+/-). O cassete contém a sequência promotora do gene COR15a (promotor frio induzido) fusionada ao gene ipt, codificador da enzima isopenteniltransferase50
- Figura 7** Esquema do cassete pEmukn (Last et al., 1991), com promotor Emu (construído artificialmente, de maior expressão em Monocotiledôneas) fusionado ao gene marcador de seleção de geneticina, nptII.....50
- Figura 8** Esquema do ensaio com folhas destacadas de cana de açúcar em placas de Petri.....54
- Figura 9** Esquema ilustrativo do ensaio de câmara de crescimento de acordo com horários e temperaturas atingidas. As setas em vermelho indicam os pontos de coleta de folhas de cana de açúcar tanto para as análises de expressão transcricional quanto para as análises fisiológicas55
- Figura 10** Esquema representativo dos métodos de transformação genética de cana-de açúcar por biobalística. **A:** Explantes, meristema

apical de cana em meio MSC3. **B, C**: Calos embriogênicos multiplicados em meio MSC1. **D**: Equipamento de biobalística. **E**: Calos embriogênicos em meio osmótico, antes do bombardeamento. **F**: Calo em meio seletivo de geneticina putativo. **G**: Plântulas regeneradas em meio de seleção.....60

Figura 11 Análise da presença do gene *ipt* em eventos putativos. Gel de agarose 1%, mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar. **M**: marcador de peso molecular 1kb plus; **B**: branco (água); **F1, I2, E3, J5, M1**: eventos escolhidos para análises posteriores; **C**: planta controle não transformada; **7**: evento transformado; **C+**: planta controle não transformada + plasmídeo pIBI34.....62

Figura 12 Análise da presença do gene *nptII* em eventos putativos. Gel de agarose 1%, mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar. **M**: marcador de peso molecular 1kb plus; **B**: branco (água); **1 a 5**: eventos transformados; **C-**: planta controle não transformada; **F1, I2, E3, J5, M1**: eventos escolhidos para análises posteriores; **C+**: planta controle não transformada + plasmídeo pEmuKn.....62

Figura 13 Foto ilustrativa do experimento de senescência com folhas de destacadas de cana-de-açúcar mediante tratamento sob diferentes temperaturas, no escuro63

Figura 14 Alterações do conteúdo de clorofila total em segmentos foliares de cana-de-açúcar incubados no escuro. **M1, E3, J5**: referem-se a eventos transgênicos; **C-**: planta controle não transformada. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio padrão. Letras minúsculas referem-se a colunas do mesmo tratamento (comparação entre plantas); letras maiúsculas referem-se à comparação de cada evento e controle entre tratamentos (diferentes temperaturas). Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade64

Figura 15 Alterações do conteúdo de clorofila total em segmentos foliares de plantas de cana-de-açúcar sob diferentes condições de

temperatura. **M1, F1, I2, E3**: referem-se a eventos transgênicos; **C-**: planta controle não transformada. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio padrão. Letras minúsculas referem-se a colunas do mesmo tratamento (comparação entre plantas); letras maiúsculas referem-se à comparação de cada evento e controle entre tratamentos (diferentes temperaturas); letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....65

Figura 16 Conteúdo de MDA em eventos transgênicos e planta controle de cana-de-açúcar, sob temperaturas distintas. **M1, F1, I2, E3**: eventos transgênicos. **C-**: planta controle não transformada. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio padrão. Letras minúsculas referem-se a colunas do mesmo tratamento (comparação entre plantas); letras maiúsculas referem-se à comparação de cada evento e controle entre tratamentos (diferentes temperaturas); letras iguais não v apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade67

Figura 17 Verificação de danos de membrana e morte celular em eventos transgênicos e planta controle de cana-de-açúcar, ao longo de temperaturas distintas. **M1, F1, I2, E3**: eventos transgênicos. **C-**: planta controle não transformada. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio padrão. Letras minúsculas referem-se a colunas do mesmo tratamento (comparação entre plantas); letras maiúsculas referem-se à comparação de cada evento e controle entre tratamentos (diferentes temperaturas); letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....68

Figura 18 Rendimento quântico potencial do fotossistema II em plantas transgênicas e controle de cana-de-açúcar após ensaio de frio em câmara de crescimento. **M1, F1, I2, E3**: eventos transgênicos, **C-**: planta controle não transformada. Letras minúsculas referem-se a colunas do mesmo tratamento

(comparação entre plantas); letras maiúsculas referem-se à comparação de cada evento e controle entre tratamentos (diferentes temperaturas); letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....69

Figura 19 RT-PCR de folhas de cana-de-açúcar submetidas a ensaio com baixas temperaturas. A) Bandas obtidas em gel TAE1X (1%) comprovam concentrações de RNA total similares entre todos os eventos, sob os diferentes tratamentos. B) Expressão dos genes gapdh e ipt das plantas transformadas sob temperaturas distintas70

Figura 20 Expressão do gene ipt em plantas de cana-de-açúcar transgênicas, normalizada com o gene gapdh. A razão da expressão do gene ipt/gapdh do evento I2 no dia 0 (menor valor obtido) foi arbitrariamente definida como 1 para melhores comparações70

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4D	2,4-diclorofenoxiacético
ABA	Ácido abscísico
ABRE	ABA responsive transcription
ADH	álcool desidrogenase
ADP	Adenosina difosfato
AHK	Arabidopsis Histidine Kinase
AMP	Adenosina monofosfato
AphA	fosfatase/fosfotransferase ácida A
ARRs	Arabidopsis Responsive Regulators
ATP	Trifosfato de adenosina
CaMV 35S	Vírus do mosaico da couve-flor
CBF	C-binding factor
CKs	citocininas
COR	Cold regulated
CRT/DRE	C-repeat/dehydration-responsive element binding factor
Cz	cis-zeatina
DMAPP	dimetilalilpirofosfato
dNTP	dideoxi-nucleotídeos trifosfatos
DZ	diidrozeatina
EST	expressed sequence tag
Fv/Fm	Fluorescência variável/ Fluorescência máxima
GISH	Hibridização genômica in situ
HSP	heat shock protein
iP	isopenteniladenina
iPMP	isopenteniladenosina-5-monofosfato
iPR	iPribosídeo
iPRMP	iP-ribosídeo-5'-monofosfato
ipt	isopenteniltransferase
JÁ	Ácido jasmônico

HVA	Homovanillic acid
LEA	Late Embryogenesis Abundant
nptII	Neomicina fosfotransferase
SAG	Senescence-associated gene
SARK	Senescence-associated receptor-like kinase
SB	Sódio ácido bórico
TAE	Tris aceto-EDTA
tRNA	RNA transportador
tZ	transzeatina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	CANA-DE-AÇÚCAR	21
2.2	ESTRESSES ABIÓTICOS	23
2.2.1	Estresses por baixas temperaturas	24
2.2.1.1	Resfriamento	25
2.2.1.2	Congelamento	25
2.2.1.3	Danos celulares em resposta ao frio	26
2.2.2	Estresse de frio em cana-de-açúcar	28
2.3	SENESCÊNCIA	31
2.3.1	Citocininas	33
2.3.2	Citocininas e fotossíntese	37
2.3.3	Citocininas e o frio	38
2.4	GENE E PROMOTOR	40
2.4.1	ISOPENTENILTRANSFERASE (IPT)	40
2.4.2	Promotor frio induzido COR15a	43
2.5	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR	45
3	MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA	49
3.1.1	Material vegetal	49
3.1.2	Obtenção de calos embriogênicos	49
3.1.3	Vetores usados para co-transformação	50
3.1.4	Co-transformação genética via biobalística	51
3.1.5	Seleção, regeneração e multiplicação eventos	51
3.2	CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSGENE	52
3.2.1	Extração de DNA genômico de planta	52
3.2.2	PCR	52
3.3	ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO FRIO	53
3.3.1	Ensaio de senescência em folhas destacadas	53
3.3.2	Ensaio de plantas em câmara de crescimento	54

3.4	CONTEÚDO DE CLOROFILA FOLIAR	55
3.5	AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS (CONTEÚDO MDA)	55
3.6	AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE ESTABILIDADE DE MEMBRANA CELULAR (IEM).....	56
3.7	AVALIAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA.....	57
3.8	Análise de expressão do transgene	57
3.8.1	Extração de RNA	57
3.8.2	RT_PCR Semi-quantitativo.....	58
3.9	PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	58
4	RESULTADOS	60
4.1	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA	60
4.2	Análises moleculares.....	61
4.2.1	PCR	45
4.3	ENSAIO DE TOLERÂNCIA AO FRIO	62
4.3.1	Ensaio de senescência com folhas destacadas	62
4.3.2	Ensaio de plantas em câmara de crescimento	65
4.3.2.1	Conteúdo de clorofila foliar	65
4.3.2.2	Teores de MDA.....	66
4.3.2.3	Índice de integridade de membrana.....	67
4.3.2.4	Análise de fluorescência de clorofila	68
4.3.3	Análise de expressão do transgene – RT-PCR Semi quantitativo.....	69
5	DISCUSSÃO.....	71
6	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma planta nativa de áreas tropicais, com via fotossintética C4, o que lhe confere alta produtividade e eficiência na utilização de recursos para insumos agronômicos (Kromdijk *et al.*, 2008). Sua distribuição estende-se aos dois hemisférios, ocupando uma área maior de 20 milhões de hectares distribuídos em 121 países (FAO, 2009).

Com clima favorável e extensas áreas agricultáveis, o Brasil, além de destaque como produtor em alimentos, agora se consolida como líder no mercado de Agroenergia. São 7,5 milhões de hectares cultivados em todo o país, com o setor sucroenergético responsável por 2,0% do PIB (Produto Interno Bruto) nacional segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Neste cenário, a cultura da cana-de-açúcar tem um papel fundamental para atender a demanda dos mercados nacional e internacional por etanol.

A manutenção da liderança brasileira no setor sucroalcooleiro depende do desenvolvimento de novas tecnologias e avanços nas tecnologias já utilizadas. Como toda cultura agrícola, a produção de cana-de-açúcar é influenciada por um grande número de fatores ambientais, e a busca por altos rendimentos a baixos custos implica em conhecer mais detalhadamente a fisiologia e a genética da cultura.

O melhoramento genético convencional da cana-de-açúcar tem obtido relativo sucesso no atendimento do setor produtivo, e é realizado através dos métodos tradicionais de cruzamentos e seleção de plantas. A cultura da cana-de-açúcar, da década de cinquenta até o momento atual, duplicou o rendimento de açúcar por tonelada de cana moída, aumentou e estabilizou também a produtividade agrícola. Isto se deu graças à introdução de novas tecnologias, principalmente variedades melhoradas geradas em diversas instituições de pesquisa. Como exemplo de sucesso, diversas variedades advindas do melhoramento genético clássico desenvolvido pelos centros de pesquisas e estações experimentais como IAC (Instituto Agronômico de Campinas), CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) e Ridesa (Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do setor Sucroalcooleiro) são amplamente cultivadas em todas as regiões canavieiras do Brasil.

Entretanto, ainda persistem perdas de colheitas devido a influências bióticas (pragas e doenças) e abióticas (deficiência hídrica, solos com baixa fertilidade e temperaturas extremas). Além disso, com o decréscimo da diversidade genética, diminuíram as opções disponíveis para enfrentar problemas através das técnicas tradicionais de cruzamento, apesar de que, sem dúvida, essas técnicas ainda continuarão essenciais no futuro. Avanços para minimizar estas dificuldades surgirão das vantagens oferecidas pelas novas biotecnologias, como a criação de organismos geneticamente modificados.

A habilidade de resistir a baixas temperaturas e ao resfriamento é um fator determinante para a distribuição geográfica e para a produtividade de culturas agrícolas. Mesmo em áreas consideradas adequadas para o cultivo de dada cultivar ou espécie, freqüentemente ocorre diminuição do rendimento e a quebra de safra em resposta às temperaturas anormais de congelamento. O estresse por frio, que inclui temperaturas acima (*chilling*) e abaixo (*freezing*) de 0°C, causa perdas severas na maioria das culturas, devido à formação de gelo extracelular (Xin e Browse, 2000).

Apesar das tentativas para minimizar danos às culturas sensíveis ao frio através de práticas de elevados custos de energia, ainda há perdas econômicas substanciais resultantes do resfriamento, contabilizadas anualmente numa larga faixa de culturas agrícolas (Steponkus *et al.*, 1998). A cana-de-açúcar é considerada uma cultura sensível ao frio (Tai e Lentini, 1998), e apesar de ocupar regiões tropicais e subtropicais onde o estresse de frio não é comum, quando ocorre, diminui sensivelmente a produtividade de açúcares da cultura. No entanto, não existem muitos ensaios que avaliam o frio em cana-de-açúcar (D'Hont *et al.*, 2008). As geadas registradas em 2000 no Paraná provocaram quebra de 15% na safra de cana-de-açúcar, reduzindo a qualidade da matéria-prima e a ausência de mudas de boa qualidade para o próximo plantio. As perdas de produtividade na safra de cana culminaram na redução da disponibilidade de etanol combustível fabricado no Estado (Severo, 2009).

Algumas plantas desenvolveram mecanismos para resistir ao frio quando expostas a temperaturas não congelantes, conhecido por período de aclimação. A descoberta de alguns genes com sua expressão associada à aclimação ao frio,

conhecidos como genes *COR* (*cold-regulated*) deram margem a estudos envolvendo plantas transgênicas mais tolerantes ao frio. Baker e colaboradores (1994) isolaram um fragmento contendo a região promotora e as sequências codificando os primeiros aminoácidos do gene *COR15a* de *Arabidopsis thaliana* e uniram esse promotor ao gene *gusA*. Essa construção genética foi inserida em *Arabidopsis* via *Agrobacterium* a fim de monitorar a resposta do gene *COR15a* em diferentes tecidos da planta; o promotor foi ativado em vários tecidos quando as plantas foram submetidas a baixas temperaturas.

O estresse por baixas temperaturas também pode induzir a senescência foliar (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; He e Gan, 2003). No cenário agrícola, a senescência pode limitar o rendimento de determinadas culturas e também contribuir para perdas de culturas vegetais no período pós-colheita. Plantas transgênicas de várias espécies já tiveram seu programa de senescência alterado através da inserção do gene isopenteniltransferase (*ipt*), apresentando menor abscisão foliar, manutenção de folhas fotossinteticamente ativas por maior tempo e aumento da tolerância a estresses abióticos, principalmente a seca (Gan e Amasino, 1995; McCabe *et al.*, 2001; Rivero *et al.*, 2003). Estudos com plantas transgênicas de petúnia e crisântemo contendo o promotor frio induzido *COR15a* fusionado ao gene *ipt* (*cor15a:ipt*) resultaram na redução da senescência dessas plantas após um período de aclimação ao frio, com aumento nos teores de citocininas (Khodakovskaya *et al.*, 2005). As citocininas são fitormônios conhecidos por reduzir a senescência foliar, e controlar as taxas fotossintéticas (Yaronskaya *et al.*, 2006).

A obtenção de plantas de cana-de-açúcar com alteração em seus níveis de citocininas e mais tolerantes ao frio, pode favorecer o acúmulo de açúcares em seus colmos. Tal acúmulo pode ocorrer em razão tanto da manutenção do aparato fotossintético ativo pelo aumento na concentração de citocininas, quanto pela estabilização de proteínas de membrana durante a desidratação celular induzida por baixas temperaturas. A sacarose é conhecida por predominar entre os açúcares solúveis associados com a tolerância ao congelamento (Taiz e Zeiger, 2004).

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi a utilização de técnicas biotecnológicas visando contribuir para aumento da tolerância ao frio em cana-de-

açúcar, que é um dos estresses abióticos que mais afetam a produtividade desta cultura em regiões de latitudes mais elevadas da zona subtropical.

Especificamente, os objetivos deste trabalho foram:

- i. Transformação de plantas de cana-de-açúcar com o gene da isopenteniltransferase (*ipt*) sob controle de promotor frio-induzido *COR15a*;
- ii. Avaliação de plantas geneticamente modificadas para a tolerância ao frio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à família Poaceae, e é nativa de regiões tropicais, cujo cultivo se estende atualmente, aos dois hemisférios, com área maior que 20 milhões de hectares distribuídos em 121 países do globo (FAO, 2009).

A teoria mais aceita de sua origem considera que ela seja nativa das ilhas do Arquipélago da Polinésia, e as variedades mais produtivas tenham se disseminado através de migrações de populações desde o neolítico, para as Ilhas Fiji, Taiti, Malásia, Índia, Filipinas e China. De 1480 a 1580, coube aos portugueses e espanhóis a disseminação da cultura, visto que a produção de açúcar era um dos temas que dominava o cenário de atividades políticas e econômicas da Península Ibérica. No Brasil, as primeiras mudas de cana-de-açúcar foram introduzidas em 1502, por Martim Afonso de Souza, em Pernambuco (Cesnik e Miocque, 2004).

Até o final do século XIX a maioria das canas-de-açúcar cultivadas eram clones da espécie *Saccharum officinarum*, de alto teor de açúcar, com $2n=80$ cromossomos. Os principais avanços na reprodução ocorreram com o desenvolvimento dos primeiros híbridos, entre *S. officinarum* e espécies selvagens e vigorosas de *Saccharum spontaneum*. Inúmeros retrocruzamentos com *S. officinarum* resultaram em cultivares com rendimentos mais elevados, capacidade de safra melhorada e resistência a doenças (Cesnik e Miocque, 2004). Ao utilizar a hibridização genômica *in situ* (GISH), foi demonstrado que as cultivares modernas contêm cerca de 20% de cromossomos de *S. spontaneum*, e menos de 5% são recombinantes ou cromossomos translocados. Essas variedades foram desenvolvidas desses híbridos iniciais, e possuem $2n$ entre 100 e 130 cromossomos. Acredita-se que apenas poucos clones de *S. officinarum* e *S. spontaneum* estiveram envolvidos no desenvolvimento desses híbridos recentes (Roach, 1989 *apud* Lakshmanan *et al.*, 2005). A maioria das variedades de cana-de-açúcar provenientes de programas de melhoramento apóia-se em retrocruzamentos extensos de cultivares elites, derivadas de tais híbridos recentes. A estrutura de genoma complexa e ploidia elevada criam desafios tanto para expressão de transgenes quanto para o desenvolvimento de marcadores moleculares para esta cultura (D'Hont *et al.*, 1996; Cuadrado *et al.*, 2004).

O Brasil cresceu expressivamente no mercado mundial do açúcar nos últimos anos. De acordo com a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), a indústria da cana-de-açúcar atingiu recorde histórico com a safra de 2009, com aproximadamente 10% a mais do que a produção registrada em 2008, chegando a 567 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. Segundo James (2006), metade da produção brasileira é destinada à fabricação de álcool, o que coloca o Brasil em segundo lugar no ranking de países produtores de biocombustíveis no mundo; em primeiro lugar encontram-se os Estados Unidos, que extraem álcool do milho. O Brasil produz 13% de todo o açúcar comercializado no mundo, e com base em valores, açúcar e álcool são, respectivamente, terceira e oitava exportação mais importante do país.

No Paraná, a cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas, sendo cultivada principalmente na região norte do estado, em razão aos fatores edafoclimáticos e à proximidade com o Estado de São Paulo (principal produtor e processador de cana). São 555 mil hectares em área plantada em todo o Estado. É o segundo produtor nacional - possui 30 unidades produtoras de açúcar e álcool, com impacto econômico sobre 130 municípios. No ano passado, foram produzidas 44,8 milhões de toneladas de cana moída, 2,5 milhões de toneladas de açúcar e 2,0 m³ de etanol (Alcopar, 2010).

Há uma pressão crescente em todo o mundo para o aumento da produtividade de cultivares de cana-de-açúcar (Hanlon *et al.*, 2000), sendo altamente desejável variedades de cana-de-açúcar com maior tolerância a condições ambientais adversas. Áreas geográficas favoráveis à produção canavieira estão distribuídas entre muitos países do mundo em desenvolvimento e são geralmente propensas a estresses abióticos, principalmente à seca, e como resultado, o rendimento da cana pode ser muito baixo (Zhang, 2006).

Características como elevada ploidia, reduzida fertilidade, tamanho e complexidade do genoma, e interações complexas com o meio, tornam o melhoramento genético convencional laborioso para esta cultura. Atualmente, as técnicas de biotecnologia podem oferecer alternativas para a redução do tempo de obtenção de novos genótipos. Entre essas técnicas está a produção de plantas transgênicas, que abre novas perspectivas ao melhoramento convencional, permitindo a rápida incorporação de características desejáveis às espécies perenes.

Portanto, a geração de variedades resistentes a estresses por meio da engenharia genética é uma ferramenta com grande potencial para o melhoramento na produção de cana-de-açúcar (Zhang, 2006). Avanços recentes na biotecnologia oferecem inúmeras oportunidades que abordam questões relacionadas ao desenvolvimento de novas cultivares e de alto rendimento (Briggs e Koziel, 1998; Ellis *et al.*, 2000). Apesar dos avanços nos sistemas de transferência de DNA, a atual metodologia de transformação de cana-de-açúcar está longe da ideal; são de preocupação imediata o conhecimento acerca do desempenho e da herdabilidade de transgenes em cana, a disponibilidade de elementos adequados à expressão dos genes e o fenômeno de silenciamento de transgenes (Lakshmanan *et al.*, 2005).

2.2. Estresses abióticos

Os estudos sobre comportamento de plantas de importância agronômica frente a estresses abióticos são estratégicos para a demanda de mercado atual e para a sustentabilidade de sistemas agrícolas.

Estresses são definidos como fatores externos que exercem uma influência desvantajosa na planta. Na maioria dos casos, o estresse é avaliado em relação à sobrevivência da planta, crescimento (biomassa) ou aos processos primários de assimilação (absorção de CO₂ e minerais) que estão relacionados com seu desenvolvimento completo (Taiz e Zeiger, 2004).

Entre todos os tipos de estresses abióticos, a seca e as baixas temperaturas são as que mais afetam o crescimento vegetal. As plantas respondem ao déficit hídrico e às baixas temperaturas com um número diverso de mudanças fisiológicas e no desenvolvimento (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Os efeitos nas plantas incluem, além de outros, 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 (Hsiao, 1973). Além disso, estresses abióticos influenciam de maneira direta no crescimento dos perfilhos e na altura final dos colmos e, conseqüentemente, na produção de açúcar (Gascho e Shih, 1983). Estes estresses estão interligados por diminuírem a disponibilidade de água para as células da planta (Verslues *et al.*, 2006).

As plantas resistem a estresses através de adaptações em níveis fisiológicos, celulares, bioquímicos e moleculares, permitindo assim, sua sobrevivência. Os produtos de genes induzidos pelo estresse podem ser classificados em dois grandes grupos: aqueles que protegem a planta contra os estresses ambientais como proteínas *heat-shock* (Iba, 2002), açúcares (Tabaei-Aghdaei *et al.*, 2003), prolina (Kishor *et al.*, 1995; Parvanova *et al.*, 2004; Sairam *et al.*, 2002); glicina betaína (Holmström *et al.*, 2000) e proteínas anticongelantes (Atici e Nalbantoglu, 1999); e aqueles que regulam a expressão gênica e a transdução de sinais de resposta a estresses (Seki *et al.*, 2003).

Estresses ambientais diferentes podem induzir a expressão de uma mesma gama de genes (Xiong *et al.*, 2002; Shinozaki *et al.*, 2003; Bartels e Sunkar, 2005; Nakashima *et al.*, 2009), em que os produtos desses genes promovem tolerância a estes estresses, pela regulação da expressão de outros genes através de vias sinalizadoras de transdução (Xiong *et al.*, 2002; Shinozaki *et al.*, 2003; Nakashima *et al.*, 2009).

Muitos estudos com milhares de genes (conhecidos como *high throughput analysis*) têm sido conduzidos para definir alterações da expressão gênica em plantas submetidas a estresses (Schenk *et al.*, 2000; Kawasaki *et al.*, 2001; Oono *et al.*, 2003; 2006). Tais estudos mostraram que a transdução sinal para expressão gênica é alterada em resposta ao estresse, e conseqüentemente leva a alterações no crescimento, desenvolvimento e adaptações às condições ambientais.

2.2.1 Estresse por baixas temperaturas

As temperaturas frias causam perdas periódicas na produtividade de plantas e limitam geograficamente os locais onde importantes culturas agrícolas poderiam crescer (Thomashaw, 1998).

Especificamente em cana-de-açúcar, o frio é um importante estresse que afeta a cultura. Embora o estresse de frio seja incomum em grande parte das áreas onde a cana-de-açúcar é mais cultivada, frios ocasionais podem prejudicar severamente a cultura nessas regiões. A inserção de genes que conferem tolerância ao frio via engenharia genética, permitiria o cultivo da cana-de-açúcar em regiões sujeitas a temperaturas mais baixas durante determinado período do ano.

2.2.1.1 Resfriamento

As temperaturas de resfriamento (ou *chilling*) representam uma das principais restrições ao crescimento, desenvolvimento e distribuição das plantas. As temperaturas de resfriamento são muito baixas para o crescimento normal, mas não suficientemente baixas para a formação de gelo. A maioria das espécies de plantas tropicais e subtropicais não possui a habilidade de adaptar-se a temperaturas de resfriamento e por isso sofrem danos por temperaturas menores que 10°C. Quando plantas crescem a temperaturas relativamente altas (25 a 35°C) e são resfriadas de 15 até 10°C, ocorre dano por resfriamento: o crescimento torna-se mais lento, surgem descoloração ou lesões nas folhas e a folhagem parece encharcada, como se fosse embebida de água por longo período. Se as raízes sofrerem resfriamento, a planta pode murchar (Taiz e Zeiger, 2004).

Experimentos de resfriamento podem ser conduzidos em laboratório com exposições de plantas a baixas temperaturas (entre 2 e 6°C) sob condições apropriadas de luminosidade. As folhas de plantas danificadas por resfriamento mostram inibição da fotossíntese, translocação mais lenta de carboidratos, taxas respiratórias mais baixas, inibição de síntese protéica e aumento da degradação de proteínas existentes. Todas essas respostas parecem depender de um mecanismo primário comum, envolvendo perda de função de membrana durante o resfriamento.

2.2.1.2 Congelamento

Em contraste, plantas de áreas temperadas evoluíram mecanismos para resistir aos períodos de resfriamento, com temperaturas baixas, porém não congelantes, quando são submetidas a um período de exposição a baixas temperaturas, de não congelamento, conhecido como período de aclimação ao frio (Levitt, 1980 *apud* Xin e Browse, 2000). O período de aclimação ao frio está associado com alterações bioquímicas e fisiológicas que incluem alterações no metabolismo de carboidratos, composição dos lipídeos da membrana, conteúdo de fenilpropanóides, respiração, fotossíntese e defesas do estresse oxidativo (Allen e Ort, 2001). Em temperaturas de congelamento (*freezing*), abaixo de 0°C, ocorre

formação de gelo nos espaços intercelulares nos tecidos vegetais (Thomashow, 1998, 2001; Xin e Browse, 2000).

2.2.1.3 Danos celulares em resposta ao frio

São numerosas as alterações fisiológicas e bioquímicas conhecidas por ocorrerem em resposta ao frio, e podem ser visualizadas na Figura 1. As mudanças mais notáveis incluem redução ou interrupção do crescimento, redução do conteúdo de água no tecido foliar (Levitt, 1980 *apud* Xin e Browse, 2000), breve aumento nos níveis de ácido abscísico (ABA) (Chen *et al.*, 1983), alterações na composição da membrana lipídica (Lynch e Steponkus, 1987; Uemura e Steponkus, 1995), acúmulo de osmólitos como prolina, betaína, polióis e açúcares solúveis, e aumento nos níveis de antioxidantes (Dörffling *et al.*, 1997; Tao *et al.*, 1998).



Figura 1. Alterações fisiológicas e bioquímicas das plantas em resposta a temperaturas de resfriamento. Algumas alterações são comumente observadas quando plantas são submetidas a baixas temperaturas, não congelantes (Adaptado de Xin e Browse, 2000).

O acúmulo de gelo nos espaços intercelulares pode resultar em rompimento físico de células e tecidos, devido à formação de aderências entre o gelo intercelular, parede e membrana celular (Levitt, 1980 *apud* Xin e Browse, 2000).

No entanto, a maioria das lesões ocorre pela desidratação causada pelo próprio resfriamento (Levitt, 1980 *apud* Xin e Browse, 2000; Steponkus e Webb, 1992). Deste modo, os estresses de frio, de seca e de sal compartilham de respostas fisiológicas e alterações metabólicas como mecanismos de resposta; a desidratação pode prejudicar funções celulares de diferentes maneiras. Contudo, no caso do estresse de resfriamento, a lesão normalmente envolve efeitos na estrutura e na função de membrana (Webb *et al.*, 1994; Uemura *et al.*, 1995).

A membrana plasmática é considerada o primeiro sítio a ser lesionado pelo frio. As membranas vegetais consistem de uma bicamada lipídica entremeada com proteínas e esteróis. As propriedades físicas dos lipídeos têm grandes influências sobre as atividades das proteínas integrais da membrana, incluindo H⁺/ATPases, transporte de íons e outros solutos, assim como o transporte de enzimas das quais depende o metabolismo (Taiz e Zeiger, 2004).

Em plantas sensíveis ao resfriamento, os lipídeos na bicamada têm alta percentagem de cadeias de ácidos graxos saturados, e as membranas com essa composição tendem a se solidificar em um estado semicristalino a uma temperatura bem superior a 0°C. Como membranas tornam-se menos fluidas, seus componentes protéicos podem não mais funcionar normalmente. O resultado é a inibição da atividade da H⁺/ATPase, do transporte de solutos para dentro e para fora de células, da transdução de energia e do metabolismo dependente de enzimas. Além disso, as folhas sensíveis ao resfriamento, expostas a altos fluxos de fótons e a temperaturas de resfriamento, são fotoinibidas, provocando dano agudo ao mecanismo fotossintético (Taiz e Zeiger, 2004).

Como resposta, o acúmulo de osmoprotetores, como a sacarose e outros açúcares que ocorrem tipicamente na aclimação ao frio, parecem contribuir para a estabilização de membranas, já que essas moléculas podem proteger membranas contra o dano induzido pelo frio em experimentos realizados *in vitro* (Anchordoguy *et al.*, 1987 *apud* Thomashow, 1998, 2001).

O hormônio ácido abscísico (ABA) também mostrou mediar o desenvolvimento da tolerância ao frio, já que a desidratação e a redução na pressão de turgor induzem a biossíntese de ABA (Taiz e Zeiger, 2004; Solanke e Sharma, 2008). Em estudos de Robinson e Parkin (2008) com sequências promotoras de genes regulados pelo frio (genes *COR*) revelaram que em 83% dos promotores com os elementos cis-atuantes CRT/DRE (*C repeat/dehydration-responsive element*),

também foram encontradas sequências ABRE (*ABA-responsive element*), características de genes responsivos ao ácido abscísico (ABA).

2.2.2. Estresse de frio em cana-de-açúcar

Há uma grande demanda por variedades tolerantes a baixas temperaturas, visto que essas tornariam a produção de cana-de-açúcar mais rentável em regiões de frio mais intenso. O risco de danos por resfriamento é uma das maiores limitações de crescimento de cana-de-açúcar em latitudes maiores que 30°. Temperaturas frias prejudicam plantas maduras antes da colheita e podem cessar o rebrotamento de plantas jovens e de socas (Ming *et al.*, 2006). A temperatura ótima para o desenvolvimento de cana-de-açúcar é em torno de 35°C, e temperaturas de não resfriamento, abaixo de 20°C, reduzem significativamente seu desenvolvimento e rendimento (Moore 1987, *apud* Ming *et al.*, 2006).

O aparato fotossintético é responsável pela produção de açúcar, e é sensível tanto a temperaturas de resfriamento quanto de congelamento (Kratsch e Wise, 2000). As plantas com metabolismo fotossintético C4, como é o caso da cana-de-açúcar, diferem das plantas C3 em muitos aspectos; são principalmente distribuídas em áreas tropicais e subtropicais, e a maioria delas é classificada como sensível ao frio. A temperatura ótima para plantas C4 é geralmente mais elevada do que para plantas C3. Já foi sugerido que o crescimento reduzido em espécies C4 em áreas mais frias poderia ser atribuído a inúmeros fatores, como a elevada temperatura ótima da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase) e a uma elevada ativação energética em temperaturas abaixo de 12°C (Treharne e Cooper, 1969 *apud* Du *et al.*, 1999).

Algumas espécies de cana-de-açúcar apresentam tolerância superior em genótipos de espécies mais fibrosas como *S. spontaneum* e *S. sinense* (Irvine, 1977 *apud* Ming *et al.*, 2006). Alguns estudos avaliaram a tolerância de cana-de-açúcar ao frio por meio de ensaios com diferentes variedades comerciais provenientes dos EUA, em comparação à espécie selvagem *S. spontaneum* (Tai, 1998; Lycums, 1999). Como resultado, em plantas expostas a temperaturas de congelamento apenas a espécie selvagem mostrou tolerância significativa, observada por sua

habilidade de brotação pós-estresse (Lycums, 1999). Outro trabalho, realizado com variedades comerciais, espécie selvagem (*S. spontaneum*) e híbridos interespecíficos, avaliou as características da qualidade do suco da cana após o congelamento, a fim de estabelecer correlações entre parâmetros como pH, acidez, danos foliares causados pelo congelamento e a qualidade do suco (Tai, 1981). Contudo, a maior tolerância de alguns híbridos ao resfriamento não pode ser correlacionada significativamente aos parâmetros citados, na grande maioria das amostras analisadas. A acidez do caldo de cana após resfriamento (de uma a três semanas posteriores ao estresse) foi indicada pelo estudo como parâmetro indicativo mais confiável, no que se refere à resistência do tecido foliar aos danos causados pela exposição ao frio.

Para diminuir os possíveis danos causados por baixas temperaturas quanto à produção de sacarose, Du e colaboradores (1999) analisaram a relação entre possíveis indicadores de danos causados por geadas sucessivas, em oito variedades de cana-de-açúcar. Foi observada a relação positiva de indicadores com as atividades de algumas enzimas que atuam nas vias de degradação de açúcares, como por exemplo, a presença da enzima manitol-desidrogenase e sua correlação direta com a viscosidade do caldo, predizendo uma redução da concentração de açúcares nos colmos após exposição ao frio.

Van Heerden e colaboradores (2009) realizaram ensaios a campo, com variedades provenientes da África do Sul e Louisiana (EUA) pré, pós-geada, e no momento de colheita, a fim de comparar a qualidade da cana. Apenas duas variedades (uma de cada país) responderam à aclimatação ao frio, seguida de geada, possibilitando a manutenção da fotossíntese e maior capacidade de acúmulo de sacarose nos colmos antes da colheita.

Apesar de haver variabilidade genética para tolerância ao frio no complexo *Saccharum*, fazer cruzamentos inter-específicos básicos envolvendo diferentes espécies de *Saccharum* e variedades comerciais requer no mínimo uma década só para a introgressão de alelos que conferem tolerância ao frio (Ming *et al.*, 2006). Assim, o uso de técnicas derivadas da biologia molecular pode otimizar esse processo, como por exemplo, através de ferramentas como a biotecnologia, que pode permitir recombinação genética além da escala permitida pelo melhoramento

convencional (Zhang *et al.*, 2004). Zhang e colaboradores (2004) utilizaram marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética de *Erianthus* e *S. spontaneum*, e esclarecer a classificação molecular de espécies relacionadas a *Saccharum* além de caracterizar o real híbrido entre *Saccharum* e *Erianthus*.

Com relação a genômica funcional, poucos estudos foram conduzidos para desvendar as respostas da cana-de-açúcar aos estresses bióticos e abióticos ou o papel dos fitormônios em tais processos (Rocha *et al.*, 2007). Entre este, destacam-se os trabalhos que avaliaram as alterações no transcriptoma da cana-de-açúcar induzidos pelo frio (Nogueira *et al.*, 2003) e em resposta ao fitormônio metil-jasmonato (De Rosa *et al.*, 2005).

Nogueira e colaboradores (2003) avaliaram a expressão gênica em plântulas de cana-de-açúcar expostas a 4°C. Foram encontrados 34 genes induzidos e 25 genes reprimidos pelo frio, num total de 263 mil sequências expressas (*ESTs – expressed sequence tags*) no banco de dados de cana-de-açúcar (SUCEST – SugarCane EST). Com base nesses dados, foi proposto um modelo de resposta ao frio em cana-de-açúcar. Nesse modelo são identificados vários fatores de transcrição envolvidos na proteção contra estresse oxidativo, transportadores de açúcar, degradação protéica e síntese de parede celular. Estes genes podem ser bons alvos para estudos e possivelmente conferem tolerância ao frio em cana (Nogueira *et al.*, 2003).

Como os dados genômicos de cana-de-açúcar continuam a se expandir, genes que conferem tolerância a estresses provavelmente serão descobertos, suas vias poderão ser esclarecidas, e genes de outras espécies poderão ser incorporados ao germoplasma de variedades comerciais de cana-de-açúcar. No entanto, há muito mais pesquisas sendo conduzidas com relação aos mecanismos de tolerância para estresses em espécies como milho, arroz, trigo, *Arabidopsis* e soja, quando comparadas ao que vem sendo realizado com cana-de-açúcar (Asnagui *et al.*, 2004).

2.3. Senescência

A senescência é o estágio final de desenvolvimento, e entendê-la é importante não apenas para razões científicas, como também para propósitos práticos. A senescência prematura leva a queda da capacidade fotossintética, e conseqüentemente, a um menor rendimento. No cenário agrícola, a senescência foliar pode limitar o rendimento de determinadas culturas e também pode contribuir para perdas de culturas vegetais no período pós-colheita. Sendo assim, estudos de senescência foliar contribuirão não só para o conhecimento sobre este processo de desenvolvimento, como também para aplicações agrícolas (Gan e Amasino, 1997).

Embora ocorra de maneira dependente de idade, a senescência foliar é bastante afetada por fatores endógenos e sinais ambientais para sintonizar a curta vida das folhas e otimizar o estado das plantas (Gan e Amasino, 1997). Portanto, a senescência não é um simples processo degenerativo, mas é um processo geneticamente programado, ativo, que contribui para o bom estado das plantas (Kim *et al.*, 2006), e também desempenha um papel vital na reciclagem de nutrientes, especialmente na remobilização de nitrogênio (Himelblau e Amasino, 2001; Lim *et al.*, 2007). Não se trata apenas de um processo passivo de morte de uma folha devido à sua idade, mas também de um processo rigidamente controlado, durante o qual, componentes celulares são degradados de um modo coordenado, e só quando nutrientes são realocados para outras partes da planta, é que a célula finalmente morre (Gan e Amasino, 1997; Nooden *et al.*, 1997; Hortensteiner e Feller, 2002; Lim *et al.*, 2007). Os produtos desse processo catabólico são realocados para o desenvolvimento de órgãos, como folhas mais jovens, e germinação de sementes (Himelblau e Amasino, 2001). Em cana-de-açúcar, por exemplo, durante seu período de maturação ocorre a senescência foliar e mobilização de carboidratos das folhas (fonte) para o colmo (dreno).

Durante a senescência, as células das folhas passaram por mudanças marcantes na estrutura e no metabolismo celular. O sinal mais óbvio da senescência é a mudança das cores de verde para amarelo, vermelho ou laranja, resultado da degradação de clorofila, frequentemente combinada com acúmulo de antocianinas (Hoch *et al.*, 2001). Durante esse processo, a fotossíntese declina e a folha altera seu metabolismo anabólico para catabólico, os cloroplastos transformam-se em

gerontoplastos. Tal queda inicial é limitada às células do mesófilo, enquanto que as células da epiderme, inclusive estômatos e células do floema, permanecem intactas e funcionais (Feller e Fischer, 1994). Mesmo para as células fotossintetizantes, a degradação em seu início é apenas parcial e a compartimentalização é mantida com mitocôndrias intactas, peroxissomos e vacúolos até estágio finais (Lee e Chen, 2002; Bhalerao *et al.*, 2003).

Os açúcares são conhecidos por agir como moléculas sinalizadoras durante vários estágios de desenvolvimento da planta, incluindo a senescência foliar (Rolland *et al.*, 2002), mas os efeitos de açúcares nesse processo são derivados da luz (Veja modelo na Figura 2). O controle de açúcar na senescência é influenciado por outros fatores, como *status* de nitrogênio, condições de luz e estágio de desenvolvimento (Jordi *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 2001; Weaver *et al.*, 2001; Paul e Foyer, 2001). Uma integração entre balanço de fatores internos e externos é importante no controle da indução de senescência foliar (Yoshida, 2003), como interações entre CO₂, enriquecimento e fornecimento de nitrogênio (Wingler *et al.*, 2005). A degradação de lipídios também é ativada (Thompson *et al.*, 1998), e a degradação dos produtos desses lipídios é metabolizada e convertida em seiva elaborada para translocação para fora das folhas senescentes (Thompson *et al.*, 1998; Kaup *et al.*, 2002).

Já foi sugerido que a senescência das folhas é desencadeada por um declínio na fotossíntese dependente da idade (Hensel *et al.*, 1993). Atualmente é mais aceito que esse declínio na fotossíntese seja uma consequência de acúmulo de açúcar, especialmente durante estágios precoces da senescência (Noodén *et al.*, 1997; Wingler *et al.*, 1998, 2006; Masclaux *et al.*, 2000). Resultados de Wingler e colaboradores (2004, 2006) mostraram que a regulação da senescência por açúcares é dependente de nitrogênio, apoiando a hipótese de que a senescência é regulada através do balanço entre carbono e nitrogênio nas folhas (Masclaux *et al.*, 2000; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2002). Isto pode também explicar a senescência acelerada em plantas crescidas em elevado nível de CO₂ (Nie *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1997). Sidgurdsson (2001) afirma que o aumento de CO₂ induz a senescência em extensões bem maiores no algodoeiro com baixo fornecimento de nitrogênio, do que a mesma espécie com um fornecimento maior de nitrogênio.

Sendo assim, uma elevada razão entre açúcar e nitrogênio sinalizaria requisitos para investimentos em Rubisco e outras proteínas fotossintéticas em folhas mais velhas, com a liberação de nitrogênio disponível para o crescimento das folhas jovens, frutos e formação de sementes (Wingler *et al.*, 2004).

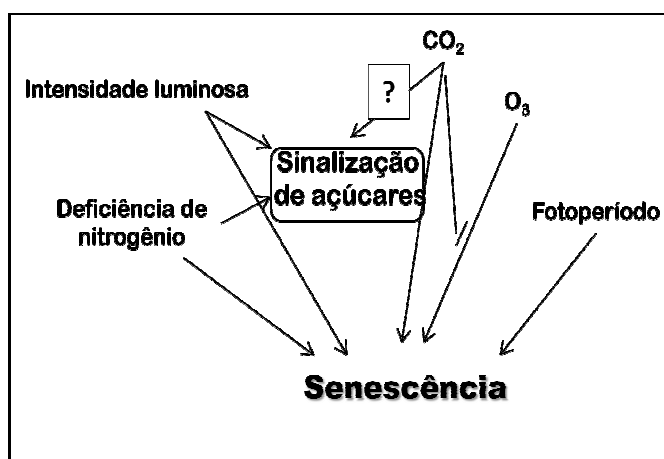


Figura 2. Modelo do papel dos açúcares, atuantes na sinalização para regulação da senescência foliar (Adaptado de Wingler *et al.*, 2005).

A complexidade da senescência foliar é sugerida por ser induzida por inúmeros fatores, conforme explicitado. Foi demonstrado que estresses bióticos (como infecção de patógenos) e abióticos (como frio, seca, alagamento, deficiência nutricional, estresse oxidativo e sombreamento) induzem a senescência (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; He e Gan, 2003).

Além disso, alterações nas concentrações de fitormônios podem reduzir a senescência pela indução de invertase extracelular e pelo aumento da utilização de açúcares (Balibrea Lara *et al.*, 2004). Uma abordagem para manipulação da senescência é superprodução de citocininas de plantas modificadas geneticamente.

2.3.1. Citocininas

Dentre os hormônios vegetais, as citocininas (CKs), possuem efeito particularmente profundo na longevidade de órgãos vegetais (Hull *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2002; Mikkelsen *et al.*, 2004). Modificações na biossíntese

de citocininas durante a fase de senescência obtidas através de transgenia podem diminuir significativamente a senescência de órgãos vegetais, incluindo folhas, e aumentar a produtividade de plantas acima de 50% (Hull *et al.*, 2000; Mikkelsen *et al.*, 2004).

Além do controle da longevidade, CKs são grupos de fitormônios que possuem muitas funções críticas nas plantas (Gan e Amasino, 1995; Kim *et al.*, 2006), como o controle de proliferação celular, formação de ramos, lançamento de ramificações (Barlier *et al.*, 2000; Bak *et al.*, 2001), proliferação de raízes (Werner *et al.*, 2001), dominância apical (Tanaka *et al.*, 2006), filotaxia (Giulini *et al.*, 2004), competência reprodutiva (Ashikari *et al.*, 2005), sinalização nutricional e realocação de nutrientes (Takei *et al.*, 2004, Barlier *et al.*, 2000; Bak *et al.*, 2001). Também é de conhecimento que as citocininas participam da manutenção de funções do meristema (Werner *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2004; Leibfried *et al.*, 2005; Kurakawa *et al.*, 2007) e da modulação do metabolismo e morfogênese em resposta a estímulos ambientais (Sakakibara *et al.*, 2006; Werner *et al.*, 2006).

São propostas duas vias possíveis para a biossíntese de citocininas: uma é derivada da degradação de tRNA e outra é derivada da isopentenilação de três nucleotídeos de adenina (Figura 3). A primeira identificação de substratos para a via foi descrita em *Dictyostelium discoideum* (Taya *et al.*, 1978 *apud* Sakakibara, 2004). Este estudo encontrou que dimetilalilfosfato (DMAPP) e adenosina monofosfato (AMP) são substratos para reações biossintéticas de duas citocininas, iP ribosídeo (iPR) e isopenteniladenina (iP), cujo produto primário resultante é iP-ribosídeo-5'-monofosfato (iPRMP). Esta reação é catalizada pela isopenteniltransferase (IPT).

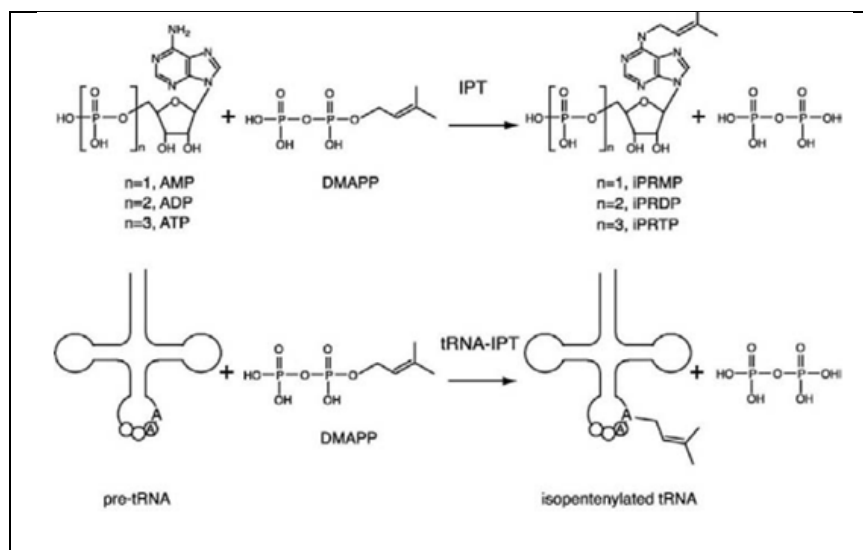


Figura 3. Reações primárias da biossíntese de citocininas catalizadas por IPT e tRNA-IPT (Sakakibara, 2005).

Como primeiro passo na biossíntese de citocininas, ocorre a transferência de um grupo isopentenil de um dimetilalil difosfato para o nucleotídeo adenina (ATP, ADP ou AMP), reação catalizada pela enzima isopenteniltransferase (IPT). Um dos grupos metil da cadeia isopentenil é então hidroxilado por uma citocromo P450 (Zhao, 2007). Em plantas superexpressando o gene *ipt*, citocininas sob a forma transzeatina (tZ) e iP super-acumulam (Faiss *et al.*, 1997; Zubko *et al.*, 2002) provavelmente devido a inativação e estoque de citocininas em excesso.

As formas naturais de citocininas ocorrentes são: transzeatina (tZ), isopenteniladenina (iP), cis-zeatina (cZ) e diidrozeatina (DZ) (Figura 4), largamente encontradas na maioria das espécies de plantas (Mok e Mok, 2001). Estas CKs diferem quanto à posição das estruturas da cadeia, hidroxilação do lado terminal da cadeia, e na posição estéreo isomérica e saturação de isoprenóides na cadeia lateral. Dentre as quatro espécies, tZ e iP são as mais comuns em plantas, mas os significados fisiológicos dessas diferenças na estrutura das cadeias laterais não são claros (Hirose, 2008).

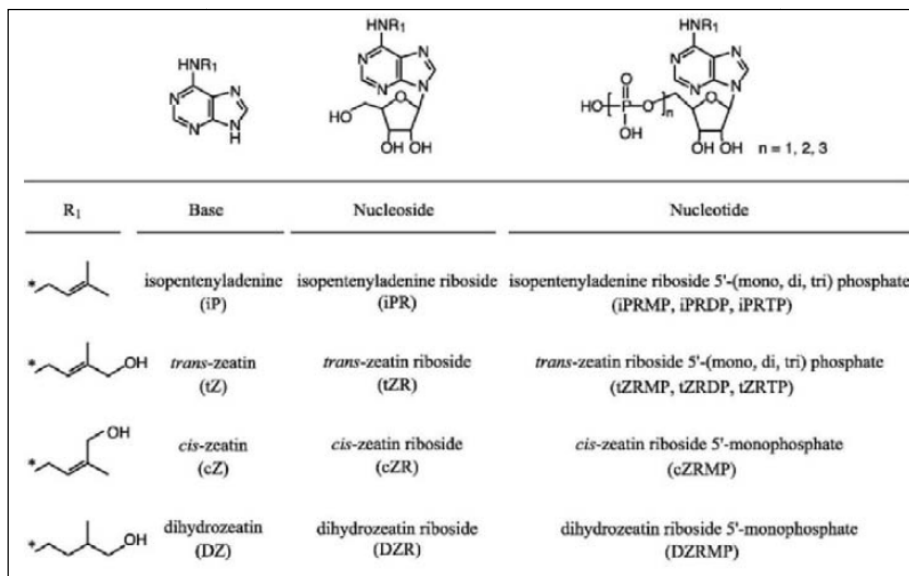


Figura 4. Nomes e estruturas de citocininas que ocorrem naturalmente. Sítio de conjugação R₁ com anel de adenina representado por asterisco (Sakakibara, 2004).

A estrutura molecular da zeatina é similar à da cinetina. As duas moléculas são derivadas da adenina ou da aminopurina. Embora elas apresentem cadeias laterais diferentes, em ambos os casos a cadeia lateral é ligada ao nitrogênio 6 da aminopurina. Nos vegetais superiores, a zeatina ocorre em ambas as configurações *cis* e *trans*, formas essas que podem ser interconvertidas por uma enzima chamada zeatina isomerase. Embora a forma *trans* da zeatina seja muito mais ativa nos testes biológicos, a *cis* também pode desempenhar um importante papel (Taiz e Zeiger, 2004) (Figura 5).

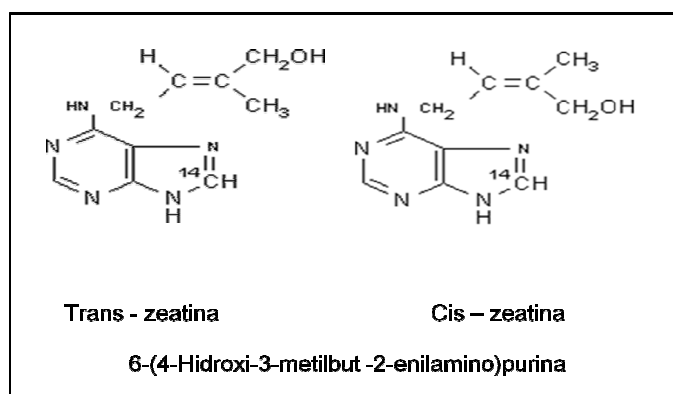


Figura 5. Diferentes formas isoméricas da zeatina.

As CKs envolvidas no atraso da senescência são, sobretudo, a zeatina e a diidrozaetina, as quais podem ser transportadas para as folhas a partir das raízes através do xilema, juntamente com a corrente de transpiração (Noodén *et al.*, 1990).

A maioria das pesquisas realizadas para se determinar o papel que as citocininas desempenham no crescimento e desenvolvimento, foi focada em análises de efeitos de aplicações exógenas de citocininas (Kieber, 2002). Tais estudos utilizaram diferentes tipos de espécies de vegetais e de delineamentos experimentais, muitas vezes dificultando possíveis comparações. Além disso, nem sempre está claro como os efeitos de aplicações exógenas de hormônios são indicadores de seu papel fisiológico. Para evitar estes problemas, níveis endógenos de citocininas foram alterados através da obtenção de plantas transgênicas expressando o gene *ipt* proveniente de *A. tumefaciens* sob o controle de diferentes promotores (Ainley e Key, 1993; Klee, 1994).

2.3.2. Citocininas e fotossíntese

As citocininas estão envolvidas no controle da formação e função dos cloroplastos, bem como suas atividades enzimáticas, acúmulo de pigmentos, e taxas fotossintéticas (Yaronskaya *et al.*, 2006); mais especificamente estimulam a expressão de enzimas fotossintéticas como a Rubisco e, de modo mais geral, o desenvolvimento de cloroplastos funcionais (Kusnetsov *et al.*, 1994 *apud* Boonman *et al.*, 2007).

Zubo e colaboradores (2008) demonstraram que aplicações exógenas de citocininas estimularam a transcrição de genes do cloroplasto em folhas destacadas de cevada, e que a habilidade dessas plantas em responder a tratamentos com citocininas depende da idade de suas células foliares. Portanto, esse trabalho demonstrou que as CKs aumentaram substancialmente e de modo diferente a transcrição de alguns genes localizados nos cloroplastos, comparando a atividade diferenciada desses genes antes dos tratamentos com esses fitormônios em cevada.

O fitormônio também parece desempenhar papel regulatório na aclimação fotossintética de diferentes gradientes de luz em dosséis, já que o transporte de citocininas sintetizadas nas raízes depende da taxa de transpiração da parte aérea (Boonman *et al.*, 2007). Em estudos de Boonman e colaboradores (2007) com

plantas de tabaco e *Arabidopsis*, concluiu-se que a distribuição de citocininas está envolvida com a regulação da aclimação fotossintética de toda planta aos diferentes gradientes de luz dos dosséis.

A proteção dos processos bioquímicos associados à fotossíntese através da produção de citocininas pode ser verificada em estudos realizados por Rivero e colaboradores (2009) com plantas de tabaco transgênicas contendo o cassete pSARK:*ipt* durante o estresse hídrico. Esse trabalho mostrou que a produção de citocininas culmina com a proteção de processos bioquímicos associados à fotossíntese e a indução da fotorrespiração durante o estresse hídrico, o que pode contribuir com a proteção da fotossíntese durante a seca. Essas plantas transgênicas indicaram a possibilidade de aumentar sua eficiência na captação de água e aumento da tolerância ao déficit hídrico.

A adaptação das plantas à deficiência de água está associada a rearranjos estruturais e funcionais da maquinaria fotossintética, e muitas dessas mudanças são reguladas por CKs (Chernyad'ev, 2005), visto que estes fitormônios aceleram a regeneração e a formação de novos cloroplastos através da regulação da formação de membrana, além da síntese de componentes da cadeia transportadora de elétrons (Veselova *et al.*, 2006).

2.3.3. Citocininas e o frio

Os mecanismos de percepção de estresses ambientais pelas plantas e a conversão destes sinais em respostas fisiológicas, em consequência aos fenômenos físicos (como a escassez de água ou temperaturas extremas) ainda são alvo de muitos estudos. Entretanto, os hormônios vegetais são fortes candidatos em possuir importantes papéis na transformação desses sinais, ativados por estresses, em mudanças fisiológicas, decorrentes de alterações na expressão gênica. As baixas temperaturas restringem o crescimento das plantas por inibição do ciclo celular, e os hormônios vegetais desempenham um papel importante neste processo. No entanto, os mecanismos moleculares em que fitormônios afetam o crescimento a baixas temperaturas ainda são amplamente desconhecidos (Xia *et al.*, 2009).

A interação antagônica entre ABA e CKs em processos como senescência, transpiração, formação de sementes e dormência de gemas, levou

muitos pesquisadores a investigarem se os seus níveis relativos podem ser importantes na revogação dos efeitos de estresse (Hare *et al.*, 1997b). Níveis endógenos de ABA aumentam em muitas espécies por exposição a baixas temperaturas e a aplicação de ABA também é capaz de induzir resistência ao frio em algumas espécies (Chandler e Robertson, 1994; Ryu *et al.*, 1995). Já foi descrito que a atividade das citocininas aumenta nas raízes durante o armazenamento frio de estacas de uva cortadas (Skene, 1972 *apud* Hare *et al.*, 1997b) e em gemas de álamo durante o resfriamento e processo de formação dessas plantas (Hewett, 1973 *apud* Hare *et al.*, 1997b). Em contrapartida, estudos envolvendo monitoramento de alterações endógenas nos níveis de CKs e ABA em trigo, durante período de aclimatação e não aclimatação, sugerem que CKs não participam deste processo durante o inverno, mas são aparentemente muito importantes na continuação do crescimento durante a primavera (Taylor *et al.*, 1990 *apud* Hare *et al.*, 1997b).

A maioria dos genes regulados por citocininas caracterizados até então são conhecidos por serem controlados por outros fatores. Muitos estão envolvidos em resposta a estresses, luz ou outras perturbações ambientais, e estão frequentemente regulados por outros hormônios vegetais (Hare e Van Staden, 1997a). Esses resultados são consistentes quanto à ação de deslocamento de CKs e seu papel mediador de respostas das plantas a diversos estresses. Também ocorrem alterações nos níveis de acúmulo de citocininas de acordo com a disponibilidade de bases livres; conjugados de açúcar são estocados e formas de citocininas são inativadas (Brandon, 1992 *apud* Sakakibara, 2005).

Em ensaios de resfriamento de raízes de trigo, Kudoyarova e colaboradores (1998), observaram ligeiro acúmulo de citocininas nas raízes durante o período inicial do experimento, que foi reduzido ao longo do experimento para concentrações menores que as iniciais. Em consequência, o decréscimo abrupto na concentração de CKs nos brotos pôde ser observado 15 minutos após o início do tratamento. Tal fato pode ter ocorrido em detrimento da inibição do crescimento das folhas, sendo, portanto, importante entender os mecanismos que permitem essa redução abrupta na concentração de citocininas na parte aérea, em resposta ao resfriamento de raiz.

Sob baixas temperaturas, os teores de citocininas podem ser diminuídos, e esse decréscimo pode estar relacionado ao fechamento dos estômatos (Veselova

et al., 2005), e o teor de ácido abscísico aumenta para induzir a expressão de genes relacionados à aclimação ao frio (Xiong *et al.*, 2001). Esses resultados trazem um indício de que baixas temperaturas podem alterar os níveis de hormônios vegetais, prolongar o processo de ciclo celular, e desencadear a sinalização de vias de aclimação ao frio; no entanto, não está claro como se precede a comunicação destas vias de sinalização (Xia *et al.*, 2009).

A duração do ciclo celular em meristema radicular de milho (*Zea mays*) aumentou 21 vezes quando a temperatura foi diminuída de 25 a 3°C (Francis e Barlow, 1988). No meristema de raiz de cebola (*Allium cepa*), quando a temperatura foi diminuída de 25 para 10°C, a duração do ciclo celular aumentou 17,6 para 69 h (Giménez-Abian *et al.*, 2004). Análises do crescimento de folhas de milho mostraram que a temperatura de resfriamento aumentou a extensão do ciclo celular em 64% em relação à temperatura normal, mas, em contrapartida, não afetou o tamanho das células maduras. Tal fato sugere que a taxa de crescimento diminuiu a baixas temperaturas como resultado de um período prolongado do ciclo celular, e não de uma redução na expansão celular total (Rymen *et al.*, 2007). No entanto, mecanismos associados à regulação do ciclo celular em baixas temperaturas permanecem obscuros, embora uma investigação da expressão de genes relacionados ao ciclo celular tenha sido iniciada por Rymen e colaboradores (2007).

2.4. Gene e promotor

2.4.1. Isopenteniltransferase (*ipt*)

A conversão de AMP e dimetilalil pirofosfato (DMAPP) para a forma ativa de citocinina, iPMP (isopenteniladenosina-5-monofosfato), foi primeiramente identificada em *Dictyostelium discoideum* (Taya *et al.*, 1978). Posteriormente, o gene isopenteniltransferase (*ipt*) de *Agrobacterium tumefaciens* mostrou codificar uma enzima de atividade similar (Akiyoshi *et al.*, 1984 *apud* Kieber, 2002). O gene *ipt* também foi identificado em muitas outras bactérias, e sua atividade foi detectada em extratos de uma variedade de tecidos vegetais, mas as enzimas dessas plantas não foram purificadas e os genes correspondentes não foram clonados (Kieber, 2002). O aumento do nível de citocininas nas plantas tem sido obtido através de engenharia

genética pela inserção do gene *ipt*, o qual codifica a primeira enzima envolvida na síntese deste regulador de crescimento (McGraw e Burch, 1995).

Plantas transgênicas de várias espécies contendo o gene *ipt* já tiveram seu programa de senescência alterado através da superprodução de citocinas e apresentaram menor abscisão foliar, manutenção de folhas fotossinteticamente ativas por maior tempo, atraso na floração (Gan e Amasino, 1995; McCabe *et al.*, 2001), além de aumento da tolerância a estresses abióticos e bióticos (Hare *et al.*, 1997b; Zhang *et al.*, 2000; Buchanan-Wollaston, 2003; Rivero *et al.*, 2007).

Muitas estratégias foram utilizadas para manipular a expressão do *ipt* em plantas transgênicas, por meio de diferentes promotores, incluindo indução por calor, ferimento, luz e tecidos específicos. A maioria das plantas que contém construções com promotores constitutivos fusionados ao gene *ipt* exibe redução na senescência e anormalidades morfológicas e de desenvolvimento (Gan e Amasino, 1997). As elevadas concentrações foliares de citocininas causam esses efeitos negativos na morfologia, no desenvolvimento e na fertilidade das plantas (Medford *et al.*; 1989; Smart *et al.*; 1991; Wang *et al.*, 1997). Tal fato é decorrente da influência das citocininas, que podem alterar muitos processos de desenvolvimento pela superprodução desses hormônios antes da senescência.

Para evitar esse problema, um promotor específico de senescência *SAG12* foi utilizado para expressão de *ipt* (Gan e Amasino, 1995). Tal promotor ativa a expressão do *ipt* em folhas apenas no início da senescência, como resultado há um aumento no nível de citocininas, que previne a senescência das folhas e resulta na atenuação da atividade do promotor, e previne assim, o acúmulo excessivo de citocininas para um nível que poderia interferir em outros aspectos de desenvolvimento da planta. Trata-se de um *loop* autoregulatório. A senescência foliar em plantas transgênicas de tabaco contendo o referido transgene foi eficientemente retardada sem anormalidade de desenvolvimento nesses eventos (Gan e Amasino, 1997). O uso do promotor *SAG12* fusionado ao gene *ipt* também reduziu o amarelamento em alface, e brócolis antes e depois da colheita (McCabe *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001).

A senescência prematura induzida por estresse também possui efeito negativo sobre a produtividade, e plantas que permanecem verdes podem exibir aumento de resistência a estresses (Buchanan-Wollaston, 2003). O uso desse

sistema para melhorar a tolerância a estresses foi verificado primeiramente em *Arabidopsis*. A espécie foi transformada com a mesma fusão *SAG12:ipt* e mostrou além da senescência tardia, um aumento na tolerância a alagamentos (Zhang *et al.*, 2000). Outras espécies, como milho, sorgo, arroz e *Festuca pratensis* (gramínea ornamental) foram transformadas com o gene *ipt* e descritas por permanecerem verdes por um período mais longo (Thomas e Smart, 1993; Thomas *et al.*, 2003). Como consequência, tais plantas possuem elevados rendimentos e resistência contra seca e doenças (Thomas e Smart 1993; Thomas *et al.*, 2003).

Há muitos exemplos de plantas onde a senescência foliar é atrasada com sucesso quando o gene *ipt* está sob controle de outros promotores, como promotores cobre-induzido (McKenzie *et al.*, 1998), maturação e estresse-induzido (Rivero *et al.*, 2007) ou calor-induzido (Smart *et al.*, 1991). Rivero e colaboradores (2007) obtiveram plantas transgênicas de tabaco expressando o gene *ipt* dirigido por promotor maturação e estresse-induzido. Notavelmente, a supressão da senescência foliar, em razão da produção de citocininas, contribuiu para um aumento da tolerância à seca dessas plantas transgênicas, como pode ser demonstrado, dentre outras respostas, pelo vigoroso crescimento após um longo período de restrição à irrigação. Possivelmente, esta proteção deve-se a maior proteção contra os efeitos do estresse oxidativo e, como consequência, a supressão do programa de morte celular em células senescentes.

A expressão do *ipt* também já foi verificada em efeitos associados a aumento de resistência a estresses bióticos. Plantas de tabaco com o gene *ipt* sob controle de promotor induzido por fermento dificultaram severamente a alimentação e desenvolvimento de insetos nessas plantas (Smigocki *et al.*, 1993; *apud* Hare *et al.*, 1997b). Outro estudo demonstrou que o gene *ipt*, ao mediar a superprodução de CKs em tomate, aumenta a resistência ao fungo patógeno *Fusarium oxysporum* (Storti, 1994; *apud* Hare *et al.*, 1997b); e em plantas de tabaco transgênicas não enraizadas, também verificou-se uma relação do gene *ipt* com a expressão de RNAs mensageiros e a defesa de organismos patogênicos. Além disso, tem sido proposto que produtos resultantes de vias de metabolismo secundário são afetados por elevados níveis de CKs, e também são candidatos encontrados em aumento de resistência de plantas contendo *ipt* a infecção de patógenos (Smigocki *et al.*, 1993 *apud* Hare *et al.*, 1997b). Em plantas transgênicas de uma gramínea ornamental

com o gene *ipt* de *A. tumefaciens* dirigido pelo promotor constitutivo ubiquitina do milho, houve maiores teores de clorofila, perfilhamento e tolerância ao frio das plantas transgênicas quando comparadas às não transformadas (Hu *et al.*, 2005).

2.4.2. Promotor frio-induzido *COR15a*

Com os recentes avanços nos estudos dos genes relacionados a estresses abióticos e bióticos, a caracterização de promotores de genes estresse-induzidos tem aumentado nesta última década (Grover *et al.*, 2001). Os promotores constitutivos são apropriados para a obtenção de altos níveis de expressão gênica. Todavia, algumas vezes os promotores constitutivos não são desejáveis, pois a superexpressão constitutiva do transgene pode ocasionar efeitos pleiotrópicos indesejáveis para as plantas sob condições normais de crescimento (Su *et al.*, 1998; Bajaj *et al.*, 1999) e reduzir sua produtividade, já que a superexpressão de transgenes pode competir por energia e esqueletos de carbono, impedindo a síntese de RNAs e proteínas importantes para o desenvolvimento da planta. Portanto, é desejável obter plantas transgênicas que acumulam seus produtos transgênicos apenas sob condições de estresse (Rai *et al.*, 2009). A maioria dos promotores estresse-induzidos contém sequências de elementos atuando em *cis* que são reconhecidos por fatores de transcrição específicos. Exemplos de proteínas com promotores estresse-induzidos são: HSP (*heat shock protein*); RD29 (induzido por estresse osmótico), ADH (induzido por estresse anaeróbico) e COR39 (induzido pelo frio) (Jaglo *et al.*, 2001).

Muitas das proteínas possuem atividades já conhecidas e que contribuem para aumento da tolerância ao congelamento. A maioria dos genes, entretanto, codifica proteínas descobertas como as encontradas em *Arabidopsis* - COR6, COR15A, COR78, ou homólogos de proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), como a proteínas de *Arabidopsis* codificada pelo gene *COR47*. Os polipeptídeos codificados por esses genes frio-induzidos pertencem a grupos baseados na similaridade das sequências de aminoácidos, mas todos compartilham a propriedade de serem hidrofílicos. Por exemplo, o gene *COR15a* de *Arabidopsis* codifica um

polipeptídeo de 15kD que é direcionado para o estroma dos cloroplastos (Thomashow, 1994).

A primeira evidência de que os genes regulados por frio ou *cold regulated* (COR) estão envolvidos funcionalmente ao processo de aclimação ao frio foi comprovada por Artus e colaboradores (1996), através da obtenção de linhas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* com expressão constitutiva do gene *COR15a*. Os eventos superexpressando o gene *COR15a*, sob condições não aclimatadas, tiveram sua tolerância ao frio alterada, tanto em condições *in situ* quanto *in vitro*. A proteína COR15a foi localizada no estroma do cloroplasto e demonstrou oferecer proteção aos cloroplastos e protoplastos. Esses autores propuseram a atuação desta proteína na formação de estruturas hexagonais, através de alterações na curvatura da membrana interna do cloroplasto (Artus *et al.*, 1996; Steponkus *et al.*, 1998).

Nakayama e colaboradores (2007) estudaram as atividades e propriedades bioquímicas do polipeptídeo COR15a em sua forma madura (conhecido como cor15am), localizado no estroma de cloroplastos e com capacidade de formar oligômeros (apesar da aclimação ao frio não ser um pré-requisito para processos de oligomerização), proteger enzimas lábeis ao frio da inativação, e estar diretamente associados com potenciais substratos. Tais evidências sugerem novos mecanismos crioprotetores, e ainda, mesmo sem evidências diretas, os autores propõem que tais polipeptídeos possam se associar a enzimas de membranas instáveis ao frio, sob condições distintas. O mecanismo pelo qual o gene *COR15a* aumenta a tolerância ao frio é intrigante já que o aumento da sobrevivência também é uma manifestação de aumento na criostabilidade da membrana plasmática, e o peptídeo COR15a está localizado dentro do estroma, no cloroplasto (Monroy e Dhindsa, 1995). Mais investigações deverão ajudar na compreensão das bases moleculares de proteção do polipeptídeo maduro COR15am na membrana do cloroplasto (Nakayama *et al.*, 2007).

Experimentos com o perfil de transcritos durante a aclimação de *Arabidopsis* ao frio mostram que múltiplas vias regulatórias são ativadas, e uma via importante envolve a regulação da família de fatores de transcrição CBF/DREB (*C-repeat/dehydration-responsive element binding factor*) (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Robinson e Parkin, 2008). As proteínas CBF/DREB são

reguladores transcricionais que se ligam especificamente a elementos *cis*-atuantes, responsivos ao frio e à desidratação, denominados CRT/DRE (*C-repeat/DRE-dehydration responsive element*), que contêm o motivo CCGAC, presente nos promotores dos genes *COR*. Estes genes incluem *COR78*, *COR6.6*, *COR47* e *COR15a* (Cheong *et al.*, 2002). As proteínas CBF/DREB induzem a expressão de centenas de genes (Maruyama *et al.*, 2004; Vogel *et al.*, 2005), que juntos, trazem um aumento de tolerância ao congelamento (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). Tal processo envolve acúmulo de metabólitos crioprotetores de baixo peso molecular como a rafinose, sacarose e prolina (Cook *et al.*, 2004), e a produção de polipeptídeos crioprotetores, como *COR15a* (Steponkus *et al.*, 1998).

Robinson e Parkin (2008) por meio de Análise Serial de Expressão Gênica (SAGE) do perfil de sequências promotoras de 63 genes *COR*, e revelaram que 24 deles possuem elementos *cis*-atuantes CRT/DRE (CCGAC) reconhecidos por CBF/DREB. Nenhuma correlação foi encontrada entre o número de elementos CRT/DRE encontrados em cada promotor e a intensidade da expressão gênica.

2.5. Transformação genética de cana-de-açúcar

Em razão da importância global do açúcar e álcool como *commodities*, o melhoramento de cana-de-açúcar via engenharia genética tem sido alvo de interesse de multinacionais detentoras de patentes dessa tecnologia.

O melhoramento direcionado para obter tolerância a estresses em plantas de cana-de-açúcar tem mostrado considerável grau de sucesso no desenvolvimento de variedades de melhor desempenho a campo. Ainda assim, a cana-de-açúcar apresenta características que a tornam uma excelente planta para o melhoramento por meio de transformação genética, tendo em vista a facilidade de regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos cultivados *in vitro* e por sua multiplicação em escala comercial através de propagação vegetativa, o que facilitaria a distribuição de eventos transformados estáveis até os produtores (Melloto-Passarim, 2009).

Calos embriogênicos, gerados via embriogênese indireta, foram amplamente escolhidos como material alvo para receber DNA exógeno em cana-de-açúcar, principalmente em transformação mediada por microprojéteis, ou biobalística (Bower e Birch, 1992; Bower *et al.*, 1996; Gallo-Meagher e Irvine, 1996; Falco *et al.*,

2000). Um grande número dos cultivares de cana-de-açúcar até agora testados produziram calos embriogênicos de tecidos de folhas jovens, e plantas podem ser prontamente regeneradas destes calos (Chen *et al.*, 1988; Molinari, comunicação pessoal). Apesar do sucesso dessa abordagem, há algumas limitações existentes, que incluem: trabalho intensivo para desenvolvimento e manutenção dos calos embriogênicos, extensão de tempo requerido para a produção da planta transgênica, possíveis efeitos de variação somoclinal devido à exposição prolongada ao 2,4-D e as respostas dependentes do genótipo (Lakshmanan *et al.*, 2005; Snyman *et al.*, 2006). Além de calos embriogênicos, outros tecidos também foram utilizados com sucesso em transformações por bombardeamento de cana-de-açúcar, como: suspensão de células regeneráveis (Franks e Birch, 1991; Chowdhury e Vasil, 1992), meristemas apicais (Gambley *et al.*, 1993), e verticilos imaturos de folhas e inflorescências (Elliott *et al.*, 2002; Lakshmanan *et al.*, 2003).

A transformação mediada por microprojéteis é a técnica para introdução de DNA mais explorada como método de transformação de cana-de-açúcar até o momento, e começou a ser desenvolvida em meados de 1960 para inoculação de plantas intactas com partículas virais infecciosas (MacKenzie *et al.*, 1966 *apud* Lakshmanan *et al.*, 2005). O método de biobalística foi descrito inicialmente por Sanford e colaboradores (1987; 1990) e utiliza microprojéteis de ouro ou tungstênio em alta velocidade para introduzir ácidos nucléicos em células e tecidos *in vivo*; essas partículas penetram a parede e a membrana celular de maneira não-letal, alojando-se aleatoriamente nas organelas celulares. O DNA é então dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular, e integrado ao genoma do organismo receptor (Sanford, 1990; Rech e Aragão, 1998).

Em cana-de-açúcar, a biobalística foi utilizada por pesquisadores do Havaí a fim de produzir plantas transgênicas de diferentes espécies de *Saccharum* (Maretzki *et al.*, 1990). Investigações acerca de transformação mediada por microprojéteis realizadas por Franks e Birch (1991) na Austrália levaram ao desenvolvimento das primeiras plantas transgênicas de cana-de-açúcar de variedade comercial com o gene de resistência a antibióticos aminoglicosídeos, *nptII* (Bower e Birch, 1992). Em sequência, transformações por biobalística de diferentes variedades, foram relatadas por muitos laboratórios em todo o mundo (Birch e

Maretzki, 1993; Bower *et al.*, 1996; Birch, 1997; Irvine e Mirkov, 1997; Nutt *et al.*, 1999).

No entanto, o método biobalístico, mesmo sendo atrativo para cana-de-açúcar, apresenta problemas quanto à complexidade de integração, e pode gerar inserções múltiplas do transgene e resultar em silenciamento ou instabilidade do mesmo (Lessard *et al.*, 2002). Arencibia e colaboradores (1998) e Elliot (1998) avaliaram o uso da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* como método alternativo na transformação genética de cana-de-açúcar. Entretanto, o espectro natural de hospedeiro desta bactéria definido como a habilidade de formar tumor, não inclui a maioria das monocotiledôneas, como a cana-de-açúcar. São muitos os fatores que influenciam tal transformação, como: genótipo da planta, tipo de explante, linhagem de *Agrobacterium* e o vetor binário. Assim, são fundamentais a otimização e adequação de protocolos visando o uso rotineiro desta técnica nos laboratórios, ainda que haja relatos de êxito em transformação via *Agrobacterium* combinada à técnica de biobalística (Melloto-Passarini, 2009).

Plantas transgênicas de cana-de-açúcar com diferentes características de interesse comercial já foram desenvolvidas, como por exemplo, plantas resistentes a herbicidas (Chowdhury e Vasil, 1992; Gallo-Meagher e Irvine, 1996; Enriquez-Obregon *et al.*, 1998; Leibbrandt, 2003), a insetos (Arencibia *et al.*, 1997,1999; Braga *et al.*, 2003), ao vírus mosaico (Ingelbrecht *et al.*, 2004), ao vírus da doença de Fiji (McQualter *et al.*, 2004) e a bactéria causadora da escaldadura das folhas (Zhang *et al.*, 1999). Também, foram obtidas plantas transgênicas de cana-de-açúcar tolerantes ao déficit hídrico (Zhang *et al.*, 2006), com alteração na atividade da enzima polifenol oxidase e sacarose fosfato sintase (Vickers *et al.*, 2005) e produção de ácido p-hidroxibenzóico (McQualter *et al.*, 2004). A cana-de-açúcar transgênica também foi usada como plataforma para produção de um fator de estimulação humano GM-CSF empregado no tratamento da neutrofenia e anemia aplástica (Wang *et al.*, 2005).

Recentemente, em nosso laboratório, plantas transgênicas de cana-de-açúcar com maior tolerância ao déficit hídrico foram obtidas utilizando o gene *P5CS* (que controla a produção de prolina) sob controle de um promotor sintético estresse-induzido – AIPC (Molinari *et al.*, 2007). Esta construção foi feita por Zhu e

colaboradores (1998) que ligaram o complexo ABA-responsivo ao promotor mínimo da Actina (acti-100 bp) e ao intron do gene *HVA22*, formando o complexo promotor estresse induzido AIPC. Este promotor foi testado em arroz e expresso em muitos tecidos, como folhas e raízes e nas camadas de aleurona, tornando-se uma excelente ferramenta para o estudo de genes relacionados com a tolerância aos estresses abióticos em cereais (Su e Wu, 1998, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Transformação genética

3.1.1. Material vegetal

Para obtenção de explantes para a cultura de calos embriogênicos foi utilizada a variedade RB855536, obtida pela equipe do PMGCA/UFSCar (Universidade Federal de São Carlos). Essa variedade possui maturação média e é considerada de elevada produtividade agrícola e industrial, quando comparada às outras variedades comerciais. As plantas utilizadas para este estudo foram obtidas do campo experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), cujo plantio e podas são monitorados a fim facilitar informações a respeito da idade das plantas.

3.1.2. Obtenção de calos embriogênicos

Folhas imaturas (cilindros de aproximadamente 2x10 cm) de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB855536, com seis a oito meses de cultivo, 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 posterior lavagem em água destilada estéril por três vezes.

Segmentos transversais da região meristemática foram removidos e cortados transversalmente com 2-3 mm para a obtenção dos explantes a serem utilizados para experimentos de transformação (Bower *et al.*, 1996). Os explantes foram então colocados em frascos contendo meio de indução denominado MSC3, com a concentração de sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), 20 g L⁻¹ de sacarose, 3 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e solidificado com 8 g L⁻¹ de Bacto Agar. As culturas foram mantidas no escuro por quatro semanas.

Os calos embriogênicos formados foram então individualizados em placas de 25 ml contendo meio MSC1, e foram subcultivados por quatro dias antes do bombardeamento. A única modificação do meio MSC1 quando comparado ao meio MSC3 é a menor concentração de 2,4-D (1 mg L⁻¹). A concentração de auxina é reduzida para aumento da eficiência de regeneração dos calos em plântulas.

3.1.3. Vetores usados para co-transformação

O cassete *COR15a-ipt-nos* (Figura 6), contendo o gene *ipt*, de *Agrobacterium tumefaciens*, sob controle do promotor frio induzido *COR15a* de *Arabidopsis thaliana*, foi retirado do vetor pBIN19 (gentilmente cedido por Richard McAvoy, PhD, University of Connecticut) pela digestão com as enzimas *Xho*I e *Sma*I. O cassete foi subclonado nos sítios correspondentes *Xho*I/ *Sma*I do vetor pBluescript II KS(+/-) por ligação com terminações coesivas, dando origem ao plasmídeo pIBI34. Esta construção (pIBI34) foi utilizada em concentrações equimolares para co-bombardamento com o vetor pEmuKN (Last *et al.*, 1991), que contém o gene marcador de seleção *nptII*, fusionado ao promotor recombinante Emu (Figura 7), artificialmente construído para elevada expressão em monocotiledôneas, utilizado com sucesso em transformação genética de cana-de-açúcar (Bower *et al.*, 1996; Wu e Birch, 2007).

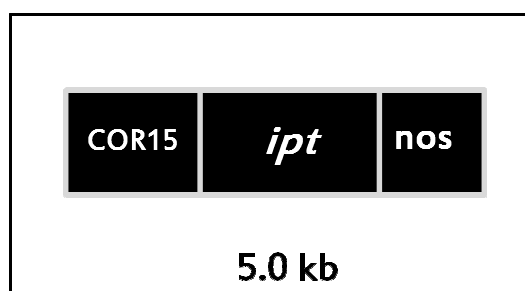


Figura 6. Esquema do cassete inserido no vetor pBluescript II Ks (+/-), originando o plasmídeo pIBI34. O cassete contém a sequência promotora do gene *COR15a* de *Arabidopsis thaliana* (promotor frio induzido), fusionada ao gene *ipt*, codificador da enzima isopenteniltransferase, de *Agrobacterium tumefaciens*.

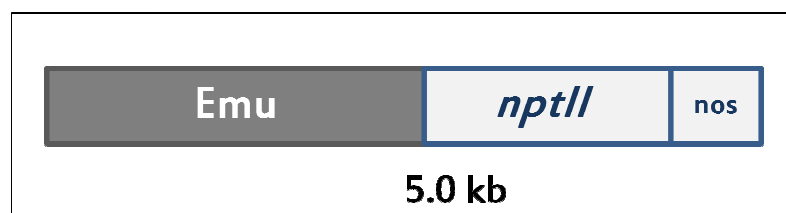


Figura 7. Esquema do cassete pEmuKn (Last *et al.*, 1991), com promotor Emu (construído artificialmente, de maior expressão em monocotiledôneas) fusionado ao gene marcador de seleção de genética, *nptII*.

3.1.4. Co-transformação genética via biobalística

O preparo da suspensão de micropartículas seguiu o protocolo de Sanford e colaboradores (1993), utilizando partículas de tungstênio da Biorad, M-17 com cerca de 1,1 μm de espessura. A suspensão de 7,5 mg de micropartículas em 1 ml de solução de suspensão, foi preparada usando os plasmídeos pEmuKn e pIBI34 em concentrações equimolares a 1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$, 125 μL de CaCl_2 (2,5M), e 50 μl de espermidina (0,1M). Cinco microlitros da suspensão de micropartículas foram depositadas em membrana carreadora e secas em suporte contendo sílica gel em câmara de fluxo laminar.

O equipamento de bombardeamento PDS-1000/He (Biorad) foi usado com pressão de vácuo de 27" Hg, 10 mm 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 1200psi e 90 mm, respectivamente. Cada amostra foi bombardeada somente uma vez.

Quatro horas antes do bombardeamento, os calos embriogênicos permaneceram em meio osmótico, constituído por meio MSC1 adicionado de 0,2M de sorbitol e 0,2M manitol (Bower *et. al.*, 1996). Logo após o bombardeamento, os calos foram transferidos para meio de indução MSC1 a 25°C no escuro por três dias.

3.1.5. Seleção, regeneração e multiplicação eventos

Decorrido o período de incubação no escuro, os calos foram transferidos para meio de seleção MSC1 contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de geneticina, sob fotoperíodo de 16h luz e intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e subcultivados a cada duas semanas em novo meio, até que se observassem calos esverdeados (Bower *et al.*, 1996).

Decorrido o processo de seleção, os calos com 5-10 mm de diâmetro foram transferidos para meio de regeneração MSC0 (meio MSC3 sem adição de 2,4-D e geneticina), a 25°C, sob fotoperíodo de 16h luz até a regeneração das plantas transformadas.

Após a regeneração foram obtidos vários clones de um mesmo evento através da multiplicação *in vitro* das plântulas. As plantas enraizadas *in vitro* foram

transplantadas em bandeja de isopor contendo substrato comercial (Plantmax TM), matéria orgânica e vermiculita (na proporção 1:1:1) para aclimação das plântulas. Após três semanas, as plantas foram transferidas para vasos de 17 litros para posteriores análises fisiológicas e moleculares.

3.2. Confirmação da inserção do transgene

3.2.1. Extração de DNA genômico de planta

O DNA genômico foi isolado de folhas de cana-de-açúcar dos eventos transgênicos e das plantas controle, de acordo com a metodologia Doyle e 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 µg ml⁻¹) em tampão SB1X e, após eletroforese, visualizados sob luz UV. A concentração do DNA foi verificada em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) segundo recomendações do manual do fornecedor.

3.2.2. PCR

A primeira análise de confirmação dos eventos putativos foi feita por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença dos genes *ipt* e *nptII*. Para isto, pequenos segmentos de folhas dos brotos selecionados *in vitro* foram utilizados para extração de DNA genômico.

Para a reação de PCR, os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *ipt* 5'-ACGACGACCGCGATAGCTCT-3' e 5'-AAGCGGCTGCGTTAACTTGG-3' e para o gene *nptII* (5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTGG-3' e 5'-ATCGGGAGCGGCGTAACCGTA-3') foram utilizados para a amplificação de fragmentos de 643 pb e 650 bp referentes às posições internas do gene *ipt* e do gene *nptII*, respectivamente.

Cada reação de volume final de 20 µl, continha 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 100 µM de cada dNTP, 1,0 U de *Taq* polimerase, 50 ng de DNA e 5 µM de cada oligonucleotídeo específico para o gene *nptII* ou *ipt*. Para a amplificação do fragmento referente ao gene *nptII*, o seguinte programa foi utilizado:

3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (1 min a 94°C; 45 s a 58°C; 1,5 s a 72°C) e extensão final de 5 min a 72°C. Para a amplificação do gene *ipt* foi utilizado: 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos (de 1 min a 94°C; 1 min a 56°C; 1,5 min a 72°C) e extensão final de 5 min a 72°C; ambas realizadas em termociclador modelo 5331 Mastercycler gradient (Eppendorf).

Os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose 1,0% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) em tampão SB 1X e, após eletroforese, visualizados sob luz UV.

3.3. Ensaio de tolerância ao frio

3.3.1. Ensaio de senescência em folhas destacadas

Para determinar a tolerância dos eventos transgênicos, foram escolhidos três eventos de transformação (M1, E3, J5) e controle não-transformado, todos com oito meses de idade, para serem submetidos a um período de permanência no escuro prolongado, sob diferentes temperaturas. Folhas escolhidas aleatoriamente das plantas foram excisadas, tiveram suas superfícies lavadas e esterilizadas com hipoclorito 0,6% por 60s, enxaguadas cinco vezes. Quatro segmentos de 5 cm cortados de diferentes folhas de cada evento foram colocadas em placas de Petri (15 cm de diâmetro) com papel filtro umedecido com água destilada estéril.

As placas foram expostas a diferentes tratamentos por um período de sete dias: (i) um período contínuo de incubação a 27°C, no escuro (27°C – dia 7); (ii) um período de indução ao frio a 4°C, por 48h no escuro, seguido por incubação a 27°C no escuro (4°C – dia 7); (iii) um período de aclimação a 4°C por 24h, seguido de uma redução de temperatura a 0°C, por seis horas, e por fim, incubados a 27°C (0°C – dia 7), sempre no escuro (Figura 8). Cada tratamento foi feito em triplicata, e a quantificação de clorofila foi feita no início e ao término do experimento.

Este experimento foi baseado em trabalhos semelhantes com petúnia, crisântemo e tomate transformados com o gene *ipt* fusionado a diferentes promotores a fim de analisar a senescência foliar após períodos de incubação no escuro (Khodakovskaya *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2005).

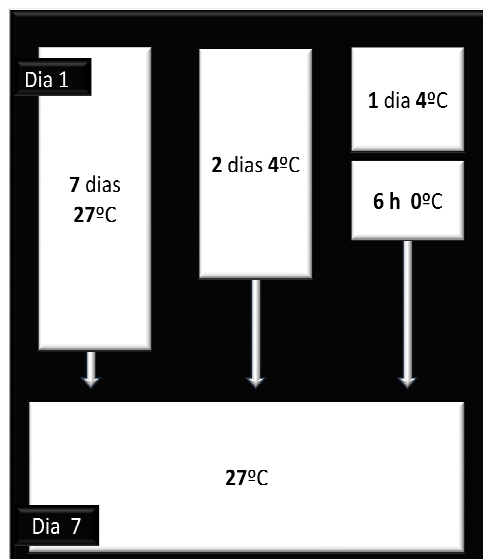


Figura 8. Esquema do ensaio com folhas destacadas de cana-de-açúcar em placas de Petri.

3.3.2. Ensaio de plantas em câmara de crescimento

Os dois eventos com melhores resultados no pré-ensaio em placas de Petri descrito anteriormente foram utilizados no ensaio de resistência ao frio em câmara de crescimento, com mais dois eventos confirmados via PCR (para os genes *ipt* e *nptII*), totalizando quatro eventos de transformação (M1, F1, I2, E3) e planta controle não transformada. Eventos foram multiplicados *in vitro* via organogênese, e aclimatados em casa de vegetação. Quatro plantas de cada um dos eventos e do controle permaneceram em vasos de três litros e foram utilizadas aos quatro meses de idade para o experimento.

Medidas de fluorescência e folhas foram coletadas em condições de casa-de-vegetação (28°C) aproximadamente 24h antes do ensaio. Decorridas 18h após estas coletas, as plantas foram levadas à ante-sala da câmara de crescimento, onde a temperatura externa era de aproximadamente 20°C, por aproximadamente 4h. Em seguida, as plantas foram colocadas na câmara com temperatura de 15°C, marcando o início do ensaio.

As coletas de tecidos foliares para análise de expressão transcricional do gene *ipt* e análises fisiológicas de clorofila foliar, MDA, índice de estabilidade de

membrana e fluorescência de clorofila, deram-se nos seguintes pontos do experimento: (i) Dia 0, em casa de vegetação aproximadamente 24h antes das plantas serem levadas à câmara de crescimento; (ii) 8h após o congelamento (Pós congelamento); e (iii) 24h após o estresse (Pós-estresse) em casa de vegetação com temperatura a 24°C (Figura 9).

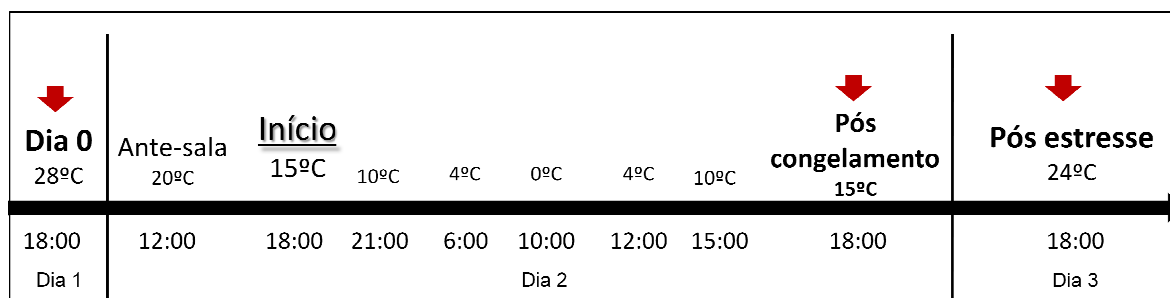


Figura 9. Esquema ilustrativo do ensaio em câmara de crescimento de acordo com horários e temperaturas atingidas. As setas em vermelho (↓) indicam os pontos de coleta de folhas de cana-de-açúcar tanto para as análises de expressão transcricional quanto para as análises fisiológicas.

3.4. Conteúdo de clorofila foliar

O conteúdo de clorofila total foi determinado segundo metodologia de Lichtenthaler (1987). A extração da clorofila foi feita em acetona 80% e a quantificação por espectrofotometria em 663 e 645 nm. Os cálculos de miligramas de clorofila por grama de massa fresca de tecido foliar basearam-se na equação:

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

3.5. Avaliação do nível de Peroxidação de Lipídios (Conteúdo de MDA)

O nível de peroxidação de lipídios foi medido em termos de conteúdo de MDA (Malondialdeído) usando a reação do ácido tiobarbitúrico, em condições normais e de estresse de frio, com folhas de cada um dos eventos transgênicos e de plantas controle foram utilizadas para a análise do conteúdo de MDA segundo metodologia de Heath e Packer (1968). Cem miligramas de tecidos foliares (sem a nervura central) foram pulverizados em almofariz e homogeneizados em solução

80:20 (v/v) etanol:água com 3 mililitros de volume final, seguido de centrifugação a 3000 *g* por 10 min. Um mililitro do extrato foi colocado em um tubo de microcentrífuga de 15 mL e misturado a mais um mililitro de solução de TCA 20% (p/v) (ácido tricloroacético) e 0,65% (p/v) de TBA (ácido tiobarbitúrico). As amostras foram então misturadas vigorosamente e incubadas a 100°C por 25 min, em seguida, transferidas para gelo e centrifugadas a 3000 *g* por 10 min. As absorbâncias foram lidas nos comprimentos de onda 532nm e 600nm. Equivalentes de malondialdeído foram calculados da seguinte fórmula:

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

Onde A_{532} indica a absorbância máxima do complexo MDA-TBA a 532 nm, e A_{600} é a absorbância a 600 nm, que corrige interferentes não-específicos e 155000 é o coeficiente de extinção molar para o MDA.

O ensaio foi realizado em triplicata e os valores expressos em nanomol de MDA por grama de massa fresca (nmol.g MF⁻¹).

3.6. Avaliação do Índice de Estabilidade de Membrana Celular (IEM)

O índice de estabilidade de membrana celular foi determinado indiretamente pela medida da condutividade elétrica, através de medições de dispersão de íons para verificar a morte celular, segundo Rizhsky *et al.* (2002).

Os ensaios foram realizados com discos foliares de cada evento e planta controle. Para cada esta avaliação, cinco discos foliares (de 9 mm de diâmetro) de cada planta foram incubados em 5 mL de água destilada por 3h a temperatura ambiente. Após a incubação, a condutividade da solução de banho foi medida por um condutímetro (modelo Micronal B331); o valor obtido é referido como valor **C1**. Os discos foliares retornaram então a essa solução de banho, introduzidos em tubos fechados e incubados com a solução de banho a 98°C por 25 minutos. Após resfriar a temperatura ambiente, a condutividade da solução de banho foi medida novamente, referida como valor **C2**. Para cada medição a dispersão de íons foi expressa como porcentagem de dispersão, segundo a fórmula:

$$\text{IEM}(\%) = (\text{valor } \mathbf{C1} / \text{valor } \mathbf{C2}) * 100$$

3.7. Avaliação da Fluorescência de clorofila

O declínio da relação F_v/F_m é um bom indicador do dano fotoinibitório quando plantas estão sujeitas aos estresses do ambiente incluindo frio (Baker *et al*, 1983).

A emissão de fluorescência máxima, para estimativa da capacidade fotoquímica do fotossistema II foi determinada por um fluorímetro portátil "Plant Efficiency Analyser", PEA (Hansatech Instruments).

As medidas foram feitas após pré-condicionamento no escuro, por uma hora, para garantir o estado oxidado dos centros de reação fotossintéticos e depois analisar o rendimento fotoquímico das plantas antes, durante e após o estresse de frio.

3.8. Análise de expressão do transgene

3.8.1. Extração de RNA

O RNA total foi isolado de folhas de cana-de-açúcar dos eventos transgênicos e das plantas controle utilizando TRIZol (Invitrogen). Após a extração, verificou-se a qualidade do RNA extraído em gel de agarose 1,0% (p/v) corado com brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) em tampão TAE 1X, após eletroforese e visualizados sob luz UV. A concentração do RNA foi verificada em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) segundo recomendações do manual do fornecedor.

3.8.2. RT_PCR semi-quantitativo

Após quantificação do RNA, foi realizado tratamento com DNase e posteriormente os cDNAs foram sintetizados utilizando-se o kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies) conforme protocolo descrito pelo fabricante. Os cDNAs utilizados para a análise de expressão do transgene *ipt* via RT-PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores 5'-ACG ACG ACC GCG ATA GCT CT-3' e 5'-AAG CGG CTG CGT TAA CTT GG-3' cujo alvo de amplificação é o gene *ipt*, e os iniciadores 5'-TCT TGC CTG CTT TGA ATG GA-3' e 5'-TGT GAG GTC AAC CAC TGA GAC AT-3' para o gene normalizador *GAPDH*. As reações foram realizadas empregando 1,0 µl da reação de transcrição reversa em tampão de reação 1X contendo 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,1 µM de cada oligonucleotídeo (senso e antisenso) e 5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Para realizar as amplificações dos genes *ipt* e do normalizador *GAPDH* dentro da fase exponencial, primeiramente foram feitas análises dos produtos de amplificação em diferentes condições e números de ciclos de PCR .

As condições de ciclagem para o gene *ipt* foram: desnaturação inicial a 94°C por 1 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min de polimerização, e a 72°C por 1,5 min; e extensão final a 72°C por 5 min. Para o gene normalizador, as condições de ciclagem foram: 94°C por 5 min, seguido de 25 ciclos de 94°C por 1 min, 59°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min. Ambas as reações realizadas em termociclador modelo 5331 Mastercycler gradient (Eppendorf).

O DNA obtido foi submetido a eletroforese em gel de agarose e corado com brometo de etídeo. A intensidade do sinal das bandas foi analisada com o sistema Kodak Digital Science 1D (KDS v.2.0.3), com o *background* da imagem subtraído. Cada tratamento foi realizado em triplicata.

3.9 Procedimentos estatísticos

O ensaio de folhas destacadas foi realizado em delineamento de blocos casualizados, devido à disposição das placas em diferentes prateleiras, e o ensaio em câmara de crescimento foi em delineamento inteiramente casualizado. Em

ambos os experimentos, a análise foi em parcelas subdivididas no tempo. As parcelas foram representadas pelas plantas controle e transgênicas e as sub-parcelas referiram-se às condições de temperaturas.

Foram feitas quatro replicações caracterizadas por um “pool” de folhas provenientes de quatro plantas dos eventos de transformação e do controle não transformado, Três repetições técnicas foram realizadas para as análises de fluorescência, clorofila, condutividade elétrica e MDA.

Os resultados foram submetidos à análise da variância, as médias sofreram comparação pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Transformação genética

Calos embriogênicos foram obtidos de segmentos transversais de folhas imaturas de cana-de-açúcar, incubados em meio MSC3 (item 3.1.2.) a 27°C no escuro por 30 dias. O esquema de obtenção de explantes, transformação e regeneração, a partir de segmentos transversais (2-3 mm) de folhas imaturas de cana-de-açúcar de material proveniente de campo pode ser observado na Figura 10.

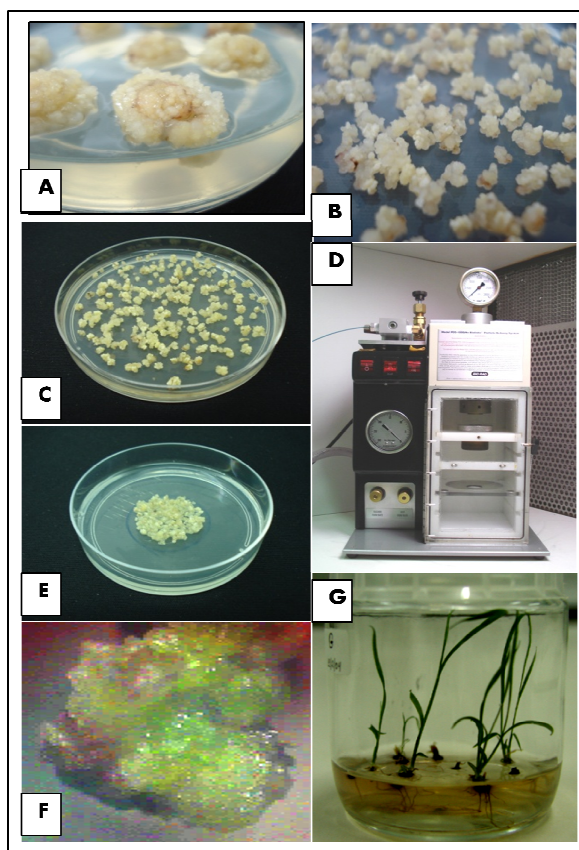


Figura 10. Esquema representativo dos métodos de transformação genética de cana-de-açúcar por biobalística. **A:** Explantes, meristema apical de cana, em meio MSC3. **B, C:** Calos embriogênicos multiplicados em meio MSC1. **D:** Equipamento de biobalística. **E:** Calos embriogênicos em meio osmótico, antes do bombardeamento. **F:** Calo em meio seletivo de geneticina putativo. **G:** Plântulas regeneradas em meio de seleção.

Para a obtenção dos eventos deste trabalho, foram cultivados aproximadamente 3500 explantes de meristema apical de cana-de-açúcar, que permitiram obter calos embriogênicos suficientes para bombardear cerca de 150 placas (exemplo, Figura 10C), que foram subcultivados em meio seletivo até a obtenção de calos verdes (Figura 10F). Destas placas, 70 eventos putativos foram cultivados até sua regeneração e crescimento das plântulas, para posterior aclimação em casa de vegetação. Dois meses após a aclimação das plântulas em casa de vegetação, nenhuma diferença morfológica aparente foi observada nas plantas transgênicas quando comparadas a plantas não transformadas.

4.2. Análises moleculares

4.2.1. PCR

Para analisar a presença dos transgenes nas plantas foi extraído DNA de potenciais eventos transgênicos regenerados em meio seletivo, em conjunto com uma planta controle não transformada, para análise por PCR (reação em cadeia da polimerase) através do uso de *primers* específicos previamente descritos no item 3.2.2. (Figuras 11 e 12).

De 70 plantas da variedade de cana RB855536 regeneradas em meio seletivo, a inserção do transgene *ipt* no genoma foi detectada em 32 plantas que mostraram a amplificação do fragmento esperado de 643 pb. Desses 32 eventos positivos, 17 mostraram amplificação apenas do gene *ipt*; 30 apresentaram amplificação para o gene *nptII*, e 15 eventos foram co-transformados, ou seja, apresentaram ambas as inserções, tanto para transgene contendo *ipt* quanto *nptII* (dados não apresentados).

Como esperado, a planta controle não transformada, não amplificou os fragmentos dos genes *ipt* e *nptII*.

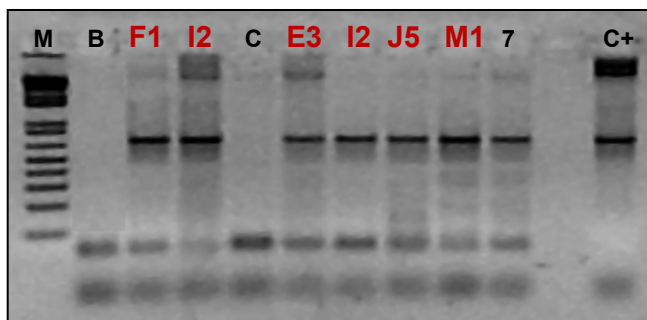


Figura 11. Análise da presença do gene *ipt* em eventos putativos. Gel de agarose 1%, mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar. **M:** marcador de peso molecular 1kb plus; **B:** branco (água); **F1, I2, E3, J5, M1:** eventos escolhidos para análises posteriores; **C:** planta controle não transformada; **7:** evento transformado; **C+:** planta controle não transformada + plasmídeo pBI34.

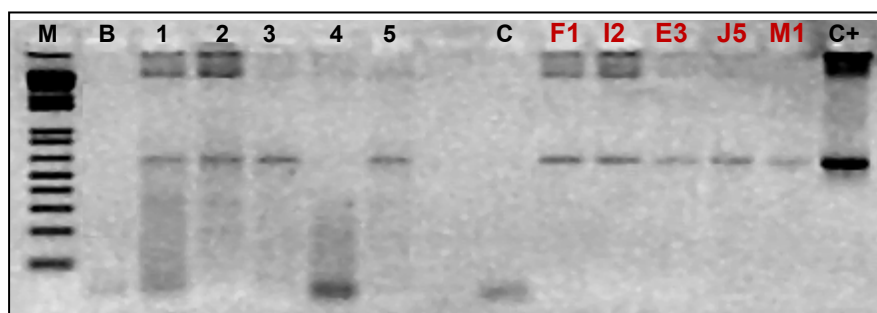


Figura 12. Análise da presença do gene *nptII* em eventos putativos. Gel de agarose 1%, mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar. **M:** marcador de peso molecular 1kb plus; **B:** branco (água); **1 a 5:** eventos transformados; **C:** planta controle não transformada; **F1, I2, E3, J5, M1:** eventos escolhidos para análises posteriores; **C+:** planta controle não transformada + plasmídeo pEmuKn.

4.3. Ensaios de tolerância ao frio

4.3.1. Ensaio de senescência com folhas destacadas

O conteúdo de clorofila total foi determinado segundo a metodologia de Lichtenthaler (1987) para todas as placas incubadas no escuro, sob temperatura de 27°C, ou após tratamento de baixas temperaturas: resfriamento (4°C - 2 dias; 27°C -

5 dias) e período de resfriamento seguido de congelamento (24h - 4°C, 6h - 0°C, 138h - 27°C), conforme Figura 8.

A análise do conteúdo de clorofila inicial das folhas destacadas foi realizada no dia de montagem do ensaio (Dia 0), com parte das folhas separadas para serem usadas nos diferentes tratamentos, não sendo observadas diferenças significativas entre os eventos transgênicos e a planta controle. Já os segmentos excisados de folhas incubadas no escuro por sete dias (27°C – dia 7) apresentaram diferenças significativas do conteúdo de clorofila foliar entre os eventos transgênicos e as plantas controle (Figura 13). Os segmentos foliares das plantas transgênicas apresentaram concentrações de clorofila mais elevadas que os segmentos foliares da planta controle. Já quando a comparação se dá entre os três eventos, o J5 apresentou os menores níveis de clorofila após sete dias no escuro.

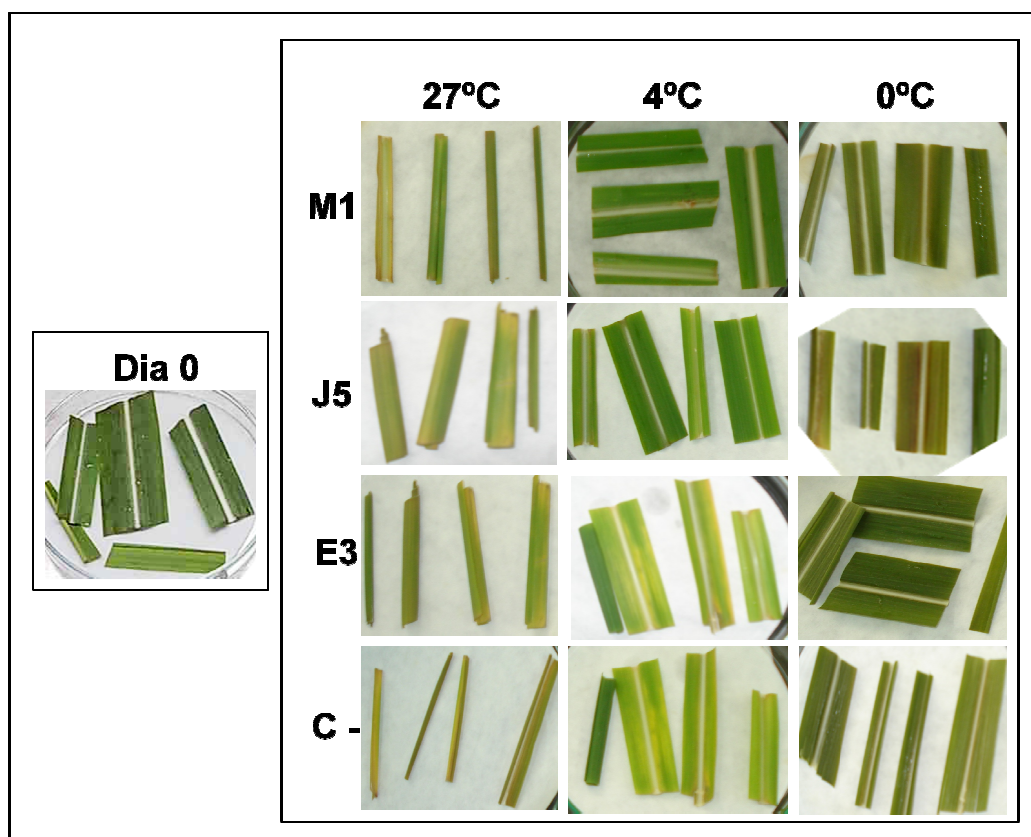


Figura 13. Foto ilustrativa do experimento de senescência com folhas de destacadas de cana-de-açúcar mediante tratamento sob diferentes temperaturas, incubados por sete dias no escuro. **M1**, **E3**, **J5**: referem-se a eventos transgênicos; **C-**: planta controle não transformada; Dia 0: Exemplo da condição dos fragmentos de folhas dos eventos de transformação e controle logo após a excisão das folhas antes do início do experimento.

Os segmentos foliares que permaneceram no escuro sob temperatura de resfriamento por 48 h e depois a 27°C até o final do experimento (4°C–dia 7) apresentaram o conteúdo de clorofila total significativamente maior nos eventos transgênicos ($P < 0,05$). O mesmo pode ser verificado quando os segmentos foliares foram submetidos à temperatura de congelamento, após um período de resfriamento (0°C – dia 7). Neste último tratamento, todas as plantas apresentaram teores de clorofila totais mais elevados em comparação aos outros dois tratamentos (a 27° e a 4°C – dia 7). Comparando-se os eventos transgênicos, com exceção do evento J5, houve diferenças significativas com relação à planta não transformada (Figura 14).

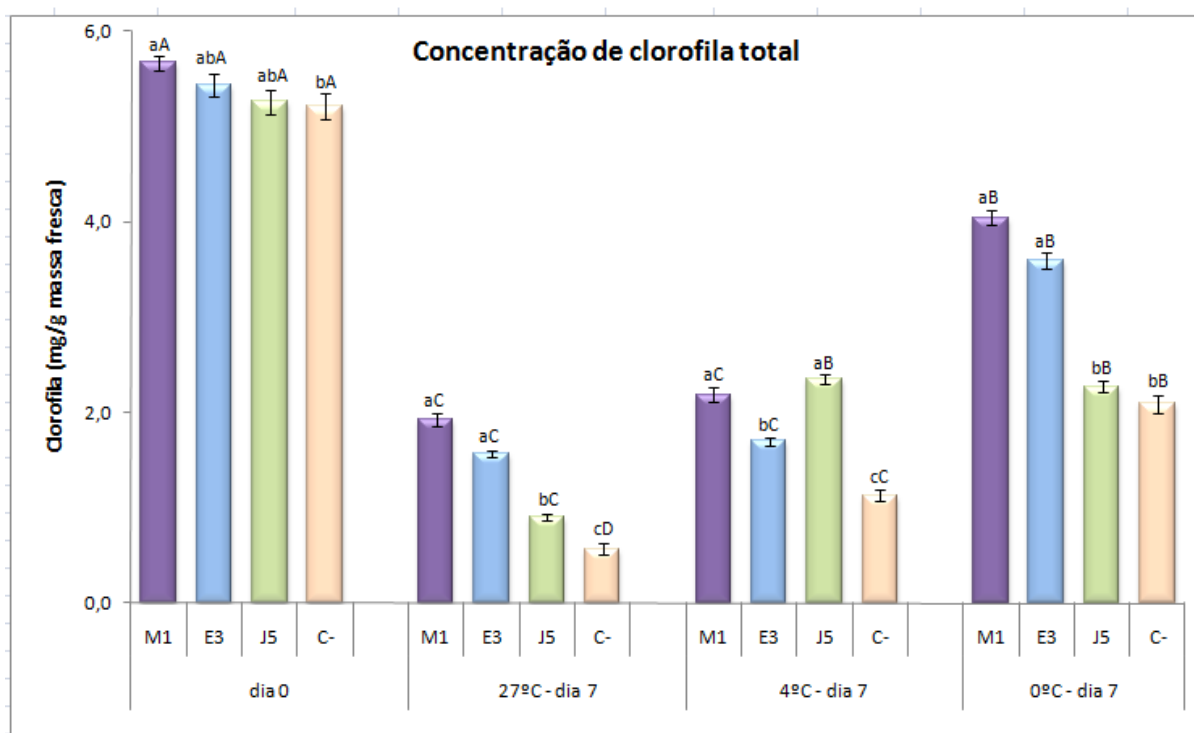


Figura 14. Alterações do conteúdo de clorofila total em segmentos foliares de cana-de-açúcar incubados no escuro. **M1, E3, J5:** referem-se a eventos transgênicos; **C-:** planta controle não transformada. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio padrão. Letras minúsculas referem-se a colunas do mesmo tratamento (comparação entre plantas); letras maiúsculas referem-se à comparação de cada evento e controle entre tratamentos (diferentes temperaturas). Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.2. Ensaio de plantas em câmara de crescimento

4.3.2.1. Conteúdo de clorofila foliar

O conteúdo de clorofila total foi determinado para todas as plantas incubadas em câmara de crescimento, em períodos: (i) que antecedem o estresse de frio (Dia 0); (ii) a 15°C, 8h após atingir temperatura de 0°C (Pós congelamento); e (iii) 24h após o ensaio de estresse (Pós estresse), conforme esquema ilustrado na Figura 9.

Medidas quantitativas do conteúdo de clorofila revelaram que segmentos foliares dos eventos e planta controle apresentaram variações no período inicial de coleta dos dados (Dia 0, Figura 15).

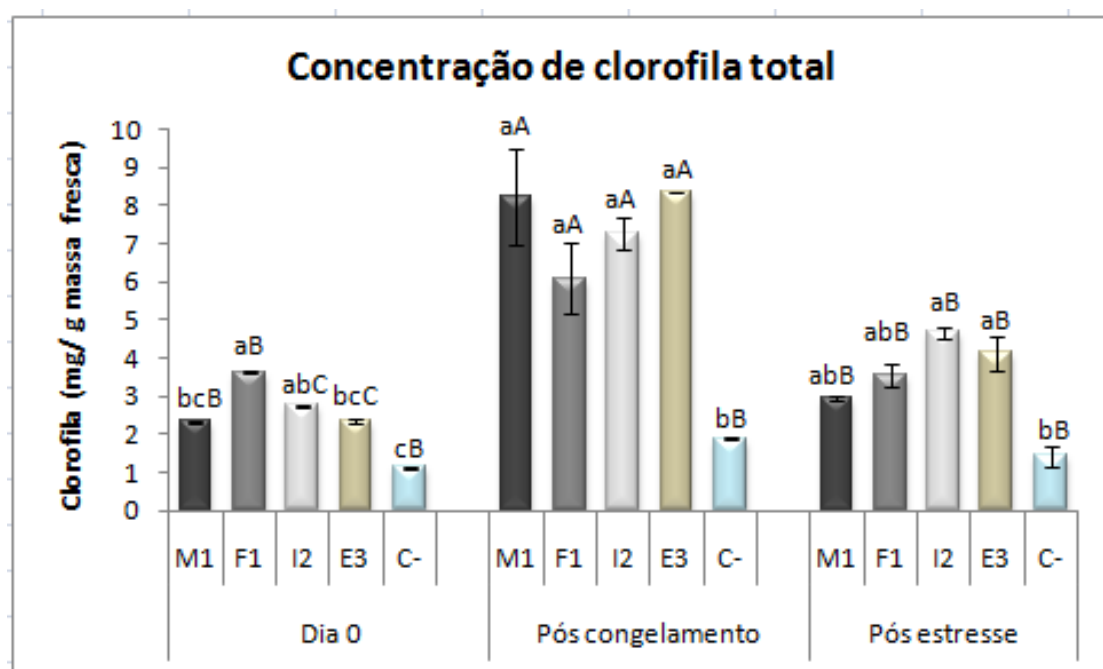


Figura 15. Alterações do conteúdo de clorofila total em segmentos foliares de plantas de cana-de-açúcar sob diferentes condições de temperatura. **M1, F1, I2, E3:** referem-se a eventos transgênicos; **C-:** planta controle não transformada. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio padrão. Letras minúsculas referem-se a colunas do mesmo tratamento (comparação entre plantas); letras maiúsculas referem-se à comparação de cada evento e controle entre tratamentos (diferentes temperaturas); letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No período de pós congelamento, todos os eventos transgênicos apresentaram níveis de clorofila foliar mais elevados que os da planta controle, e não houve diferenças significativas entre os eventos de transformação (Figura 15).

Com relação ao tratamento pós-estresse (24h após o final da aplicação do estresse), as diferenças significativas entre os diferentes eventos e o controle não transformado foram mantidas, ainda que as concentrações de clorofila tenham diminuído quando comparadas aos tratamentos anteriores (Figura 15). Vale ressaltar que os níveis de clorofila da planta controle retornaram aos níveis de clorofila observados nas folhas antes de iniciar o tratamento de frio (dia 0), enquanto que os eventos de transformação mantiveram níveis superiores a este período.

4.3.2.2. Teores de MDA

O malondialdeído, um produto secundário da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, atua como um indicativo de peroxidação lipídica. Como pode ser observado na Figura 16, os eventos transgênicos não diferiram entre si nem entre a planta controle com relação ao conteúdo de MDA no dia 0 (início do ensaio).

No entanto, no período de pós-congelamento, a planta controle apresentou peroxidação lipídica significativamente superior aos eventos transgênicos, com teores de MDA entre 55% e 40% superiores em relação aos encontrados em plantas transgênicas. No período de pós-estresse, houve ligeira queda na concentração de MDA em todas as plantas, mantendo-se significativamente superior na planta controle (Figura 16).

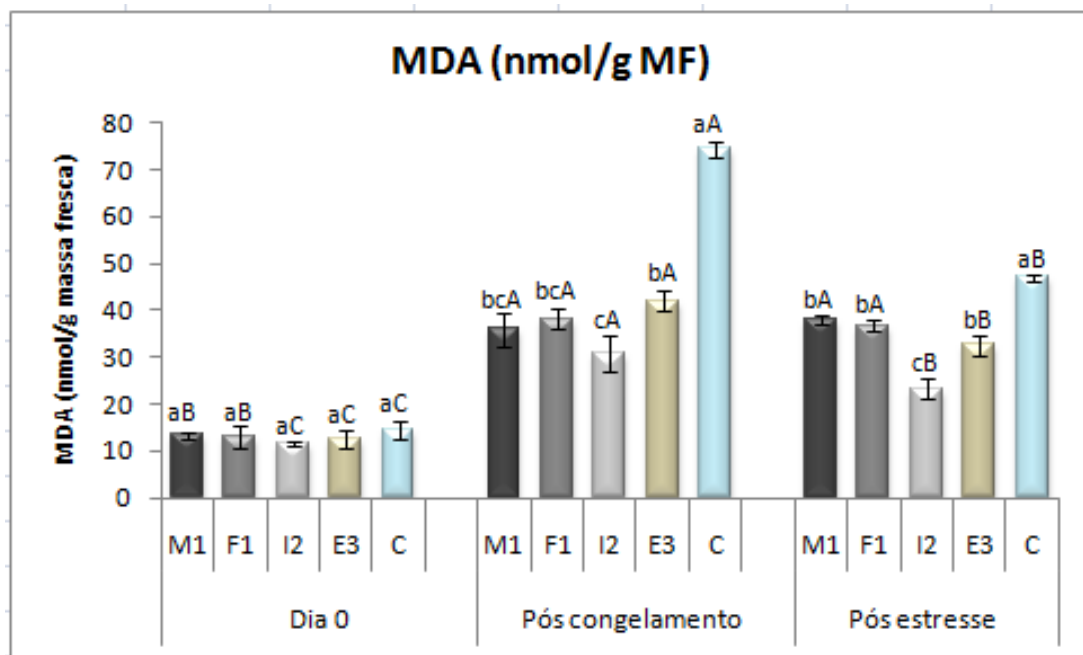


Figura 16. Conteúdo de MDA em eventos transgênicos e planta controle de cana-de-açúcar, sob temperaturas distintas. **M1, F1, I2, E3:** eventos transgênicos. **C-:** planta controle não transformada. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio padrão. Letras minúsculas referem-se a colunas do mesmo tratamento (comparação entre plantas); letras maiúsculas referem-se à comparação de cada evento e controle entre tratamentos (diferentes temperaturas); letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.2.3. Índice de integridade de membrana

Sabe-se que o extravasamento de eletrólitos está diretamente relacionado com a morte celular e é bastante utilizado como indicador de danos à membrana, que são resultantes de estresses aplicados em todas as estruturas da célula (Rizhsky *et al.*, 2002). Neste trabalho, pode-se observar a relação do estresse de frio com a diminuição da estabilidade de membrana em plantas controle; já que o choque térmico aplicado resultou em comportamento diferenciado das plantas transgênicas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Figura 17).

Como pode ser observado na figura 17, após submeter essas plantas a baixas temperaturas, o extravasamento de eletrólitos na planta controle (não transformada) chega a 40%, enquanto os eventos transformados não diferem significativamente entre si, e não ultrapassam 22% de dispersão de íons da membrana celular, demonstrando danos menores em tais plantas. No período pós

estresse (24 horas após o ensaio), todas as plantas retornaram aos níveis normais de extravasamento de eletrólitos (Figura 17).

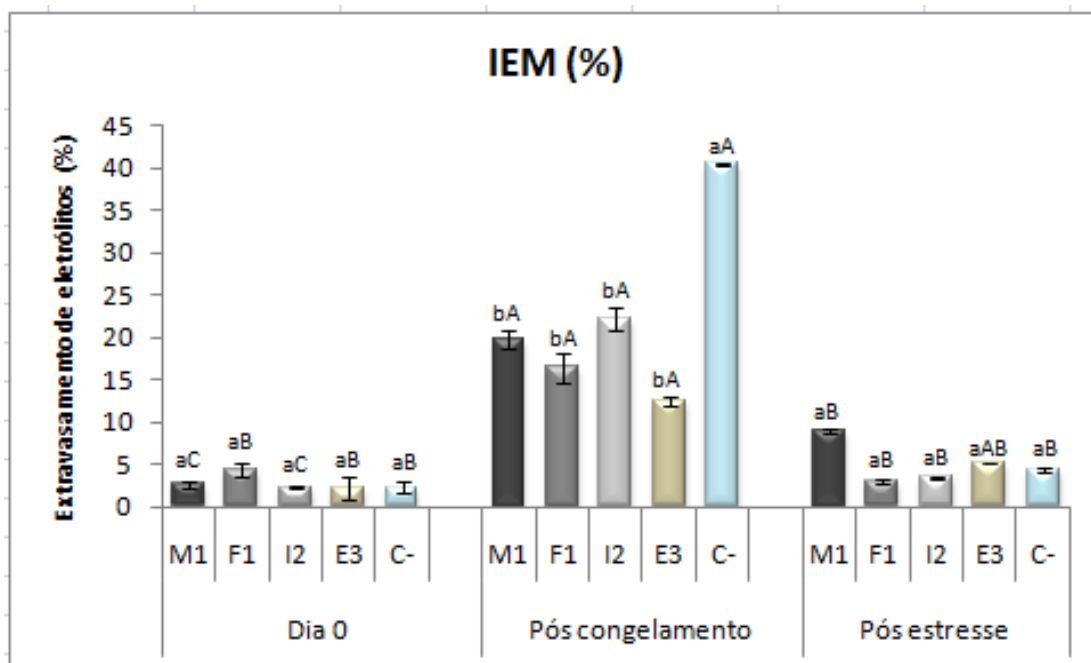


Figura 17. Verificação de danos de membrana e morte celular em eventos transgênicos e planta controle de cana-de-açúcar, ao longo de temperaturas distintas. **M1**, **F1**, **I2**, **E3**: eventos transgênicos. **C-**: planta controle não transformada. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio padrão. Letras minúsculas referem-se a colunas do mesmo tratamento (comparação entre plantas); letras maiúsculas referem-se à comparação de cada evento e controle entre tratamentos (diferentes temperaturas); letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.2.4. Análise de fluorescência da clorofila

A avaliação do rendimento fotoquímico (F_v/F_m) das plantas transgênicas e da planta controle foram avaliadas no dia 0 (período que antecede o ensaio), após estresse de baixas temperaturas em câmara de crescimento (pós congelamento) e 24h após o estresse de frio, (pós estresse) a fim de verificar a recuperação das plantas (ver Figura 9). As variações do rendimento fotoquímico entre as plantas (F_v/F_m), nos diferentes pontos de coleta dos dados, não foram significativas pelo teste de Tukey a 5% de significância, em nenhum momento do estresse, conforme pode ser observado pelo gráfico abaixo (Figura 18).

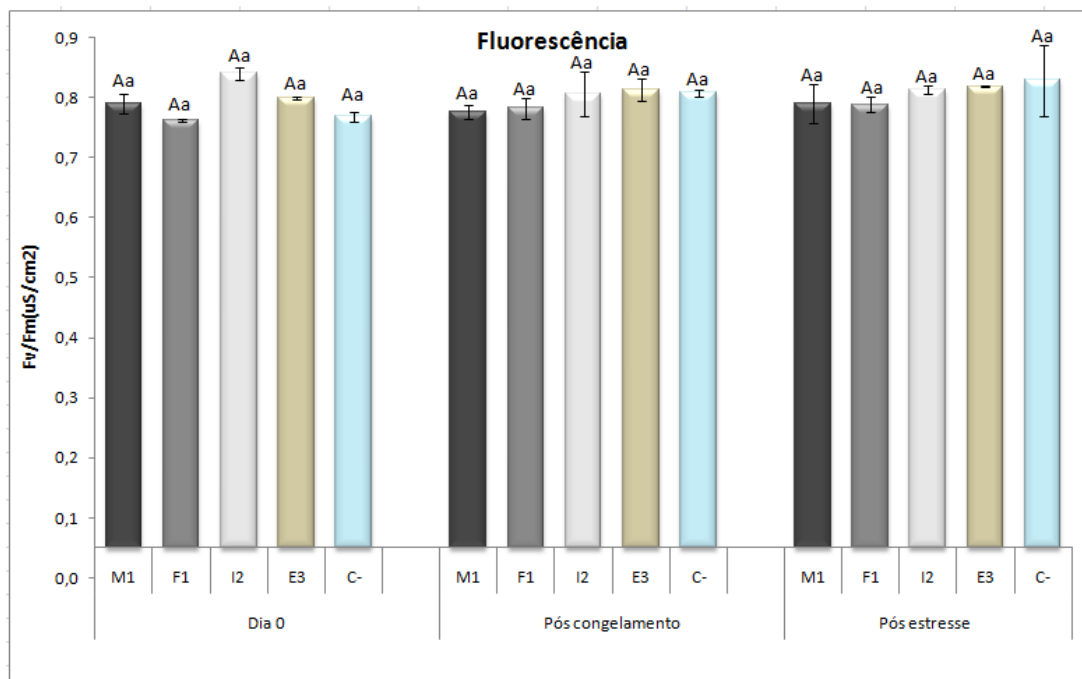


Figura 18. Rendimento quântico potencial do fotossistema II em plantas transgênicas e controle de cana-de-açúcar após ensaio de frio em câmara de crescimento. **M1, F1, I2, E3:** eventos transgênicos, **C-:** planta controle não transformada. Letras minúsculas referem-se a colunas do mesmo tratamento (comparação entre plantas); letras maiúsculas referem-se à comparação de cada evento e controle entre tratamentos (diferentes temperaturas); letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.3. Análise de expressão do transgene – RT-PCR Semi quantitativo

A expressão do gene *ipt* durante o ensaio em câmara de crescimento pode ser avaliada através da técnica de RT-PCR semi quantitativa, por meio de análise da intensidade das bandas de ambos os genes (*ipt* e *GAPDH*) (Figura 19).

No dia 0, não foi detectada expressão significativa em nenhum dos eventos (Figura 20). No tratamento pós congelamento, o evento M1 apresentou a maior expressão, 15 vezes superior ao tratamento anterior (dia 0), e cerca de cinco vezes a expressão do evento F1. Ao final do ensaio, 24h após o estresse, os eventos transformados apresentaram um aumento ainda maior na expressão do transgene. Enquanto que o evento E3 teve sua expressão aumentada somente em 7 vezes, o evento com maior expressão do *ipt* (M1) obteve expressão cerca de 40 vezes maior do que no dia 0, e 24 vezes superior ao período de pós congelamento.

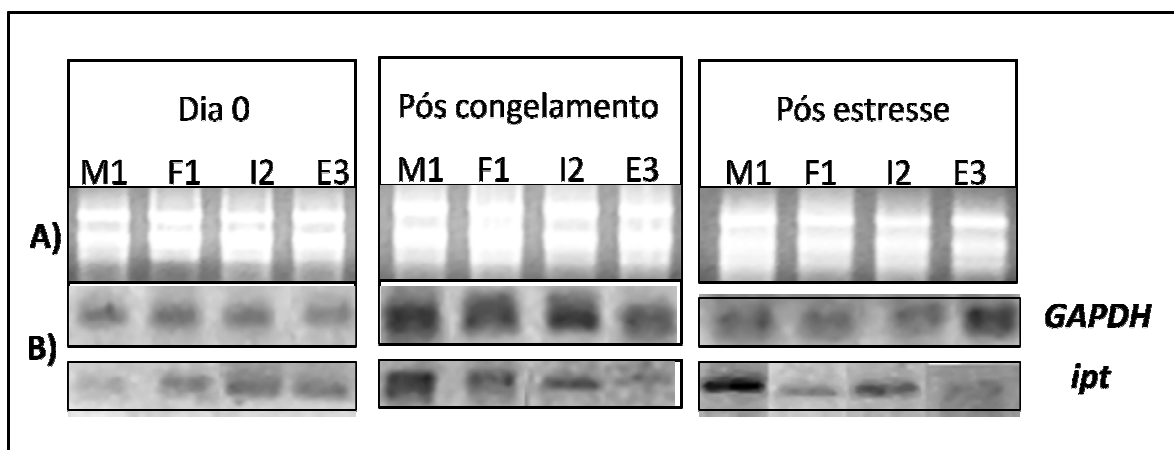


Figura 19. RT-PCR de folhas de cana-de-açúcar submetidas a ensaio com baixas temperaturas. A) Bandas obtidas em gel TAE1X (1%) comprovam concentrações de RNA total similares entre todos os eventos, sob os diferentes tratamentos. B) Produtos de PCR das plantas transformadas sob temperaturas distintas separados em gel de agarose.

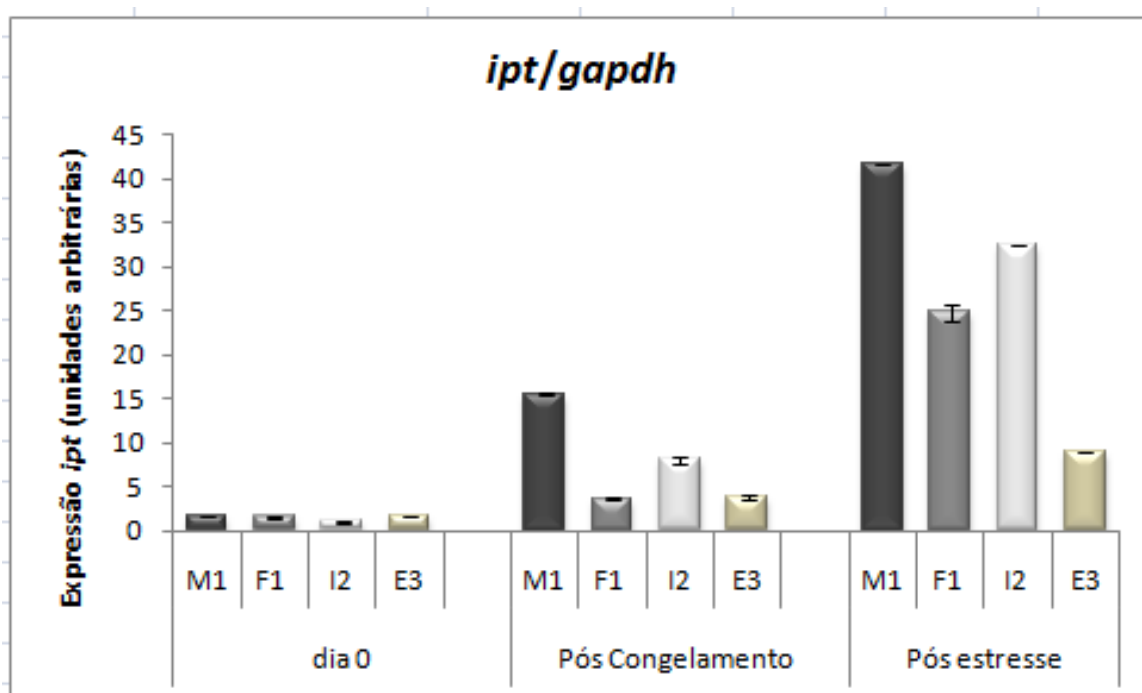


Figura 20. Expressão do gene *ipt* em plantas de cana-de-açúcar transgênicas, normalizada com o gene *gapdh*. A menor razão de expressão do gene *ipt* ($ipt/GAPDH$), evento I2 no dia 0, foi arbitrariamente definida como 1 para comparações.

Vale ressaltar que não houve detecção em gel de nenhum fragmento do gene *ipt* nas plantas controle, em nenhum dos tratamentos analisados, como esperado.

5. DISCUSSÃO

O estresse por frio pode ser dividido em estresses por resfriamento (acima de 0°C, até 15°C) e congelamento (abaixo de 0°C). Temperaturas de resfriamento são muito baixas para o crescimento normal e afetam diretamente o funcionamento celular; enquanto que o congelamento atua indiretamente, danificando as células por desidratação, devido à formação de gelo nos espaços intercelulares dos tecidos vegetais (Taiz e Zeiger, 2004). As espécies vegetais de clima temperado possuem habilidade de sobrevivência em temperaturas de resfriamento e congelamento devido ao processo de aclimação ao frio, enquanto que as espécies de clima tropical possuem pouca e nenhuma capacidade de aclimação a temperaturas mais baixas (Thomashow, 1998). Nesse contexto, cada espécie vegetal possui uma temperatura ótima de crescimento; conseqüentemente, sua distribuição geográfica é determinada pela faixa de temperatura na qual a espécie é capaz de sobreviver. A cana-de-açúcar, uma espécie vegetal de origem tropical, tem dentre as limitações que afetam a cultura, a sensibilidade ao estresse por baixas temperaturas (Tai e Lentini, 1998).

Os efeitos causados pela exposição a baixas temperaturas em cana-de-açúcar dependem de diversos fatores, tais como a intensidade do estresse (resfriamento ou congelamento), estágio de desenvolvimento vegetal, variedade, duração do estresse, entre outros (Du *et al.*, 1999). A exposição de cana a temperaturas de resfriamento por cerca de três semanas, resultou na redução do número, comprimento e peso das hastas, bem como da produção de açúcar. Já a exposição prolongada da planta a temperaturas de congelamento pode eliminar ramos novos ou em desenvolvimento durante a rebrota (Tai e Lentini, 1998).

Para atender as demandas do setor produtivo, o melhoramento genético convencional da cana-de-açúcar já obteve relativo sucesso, e é realizado através dos métodos tradicionais de cruzamentos e seleção de plantas. No entanto, com o decréscimo da diversidade genética, aliado à complexidade de seu genoma, diminuíram as opções disponíveis para enfrentar problemas através das técnicas tradicionais de cruzamento. Neste sentido, a biotecnologia surge como ferramenta importante para diminuir o custo e o tempo na obtenção dessas variedades resistentes a estresses bióticos e abióticos, como a criação de organismos geneticamente modificados.

Em trabalhos realizados por Khodakovskaya e colaboradores (2005), petúnias e crisântemos transformados com o gene *ipt* de *Agrobacterium tumefaciens*, dirigido pelo promotor do gene *AtCOR15a*, apresentaram regulação positiva deste gene codificador da isopenteniltransferase (*ipt*) após um período curto de resfriamento. Tendo em vista estes resultados, o presente trabalho buscou avaliar a resposta ao estresse de baixas temperaturas de plantas de cana-de-açúcar transformadas com esta mesma construção.

Foram obtidos 70 eventos putativos, que resultaram em 32 eventos positivos confirmados via PCR. Destes, 17 eventos mostraram amplificação apenas do gene *ipt*; 30 apresentaram amplificação para o gene *nptII*, e 15 eventos amplificaram para ambos os genes.. Neste trabalho, 47% dos eventos regenerados foram co-transformados e selecionados com o promotor *Emu* fusionado ao gene *nptII*. Outros estudos de transformação por microprojéteis em cana-de-açúcar, atingiu-se a faixa de 67-79% de êxito na seleção de co-transformantes por Bower e colaboradores (1996) utilizando o promotor *Emu* com o gene seletivo *aphA*, e 71,3% de eficiência em co-transformação por biobalística com o promotor Ubi-1 fusionado ao gene *nptII*, segundo trabalho de Melotto-Passarin (2009). O promotor recombinante *Emu* foi construído para aumentar o nível de expressão gênica em monocotiledôneas. É baseado no promotor truncado de milho, *ADH1*(álcool desidrogenase 1), com múltiplas cópias de elementos responsivos anaeróbicos do gene do milho *ADH1* e elementos do gene octopina sintase (*ocs*) de *Agrobacterium tumefaciens* (Last *et al.*, 1991).

Vale ressaltar que as plantas obtidas neste trabalho não apresentaram alterações morfológicas sob temperaturas normais de crescimento, assim como descrito em relatos de trabalhos anteriores com plantas transformadas contendo a mesma construção (Khodakovskaya *et al.*, 2005; 2006). Estes resultados podem ser relacionados à atividade estresse induzida do gene *ipt*, visto que expressões constitutivas do mesmo gene resultaram em diversas alterações morfológicas e de desenvolvimento nas plantas transformadas (Gan e Amasino, 1995).

Para medir quantitativamente os sintomas de senescência foliar em condições de baixas temperaturas, parâmetros fisiológicos e moleculares podem ser utilizados, como conteúdo de clorofila, eficiência fotoquímica, perda iônica da membrana celular, expressão gênica, entre outros, por tratar-se de marcadores de senescência bem estabelecidos (Lim *et al.*, 2007). No ensaio de senescência com

folhas destacadas, o conteúdo de clorofila divergente entre eventos e planta controle no tratamento com temperatura constante de 27°C, temperatura esta não adequada para indução do promotor *COR15a*, durante os sete dias de incubação no escuro, pode indicar a ativação do promotor *COR15a* por ferimento, visto que os segmentos foliares foram excisados para plaqueamento. Cheong e colaboradores (2002) mostraram que vários fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes envolvidos na resposta a estresses, como os *CBF/DREBs*, estão entre os primeiros genes responsivos após ferimentos. Especificamente em relação ao gene *AtCOR15a*, foi relatado que este possui sequências DRE/CRT em sua região promotora (Baker *et al.*, 1994; Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Seki *et al.*, 2001; Chinnusamy *et al.*, 2003). Ainda, tais resultados podem ser devidos a uma expressão basal do promotor *COR15a* nos eventos de cana-de-açúcar transformados, mesmo sob temperaturas mais elevadas.

Os menores decréscimos dos níveis de clorofila verificados nos segmentos foliares a 0°C indicam à maior atividade do promotor em temperaturas reduzidas. A redução da senescência foliar nos tratamentos de baixas temperaturas (a 4 e 0°C) dos eventos transgênicos quando comparados à planta controle, pode ser explicada pelo papel bem definido do promotor *COR15a* em resposta ao frio. A maior atividade deste promotor em função da redução da temperatura sinalizaria para a transcrição do gene *ipt*, cuja expressão está relacionada à redução da senescência através do aumento dos níveis de citocininas nessas plantas transformadas.

No ensaio em câmara de crescimento, realizado com plantas de quatro meses de idade, o aumento da atividade transcricional do transgene corrobora com a maior concentração de clorofila observada nos eventos de transformação. A expressão do gene *ipt* aumentou mesmo 24h após o período de estresse, com valores ainda maiores quando comparados aos níveis observados durante o estresse de frio, indicando a manutenção da atividade transcricional promovida pelo promotor *COR15a* por período prolongado nessas plantas. Embora tenha sido detectada uma alta expressão do transgene nos eventos transgênicos após o retorno destes a temperaturas não estressantes, os resultados de quantificação de clorofila, MDA e índice de estabilidade de membrana não correspondem a este aumento da atividade transcricional.

Tais dados podem ser explicados através dos diversos mecanismos regulatórios pós-transcricionais, como por exemplo: (a) a regulação negativa da atividade da isopenteniltransferase, como efetuado pelas proteínas de ligação do tipo A de ARRs (*Arabidopsis Responsive Regulators*), que estão envolvidas nos mecanismos de *feedback* negativo, e atuam na regulação das vias de sinalização das citocininas em *Arabidopsis* (To *et al.*, 2004; To e Kieber, 2007); (b) a degradação ou inativação metabólica de citocininas, já que a estabilidade das CKs é determinada por sua afinidade com outras enzimas metabólicas, como a citocinina oxidase/desidrogenase (CKX) que cataliza degradações irreversíveis deste fitormônio em muitas espécies vegetais (Mok *et al.*, 2001; Sakakibara *et al.*, 2006; Schmulling *et al.*, 2003); (c) as ligações de receptores de CKs podem ter sua afinidade reduzida de acordo com as formas de citocininas acumuladas, devido à suas diferentes propriedades bioquímicas (Werner e Schmulling, 2009). Análises da concentração de citocininas, bem como de suas formas mais ativas durante o estresse de frio nos eventos transformados poderiam auxiliar nos esclarecimentos com relação ao aumento de expressão do gene *ipt* no período pós estresse.

A não detecção de sinais de hibridização com sonda radioativa do gene *ipt* usando a técnica de Northern blot (dados não apresentados) sugere que a expressão do transgene ativada pelo promotor *COR15a* sob baixas temperaturas não pode ser caracterizada como elevada nesses eventos. No entanto, o aumento da expressão transcricional observada nos eventos F1 e I2 no período de pós congelamento em relação ao detectado nas plantas em condições normais de temperatura, foi suficiente para aumentar a tolerância dessas plantas ao estresse de frio, segundo os resultados obtidos pelas análises fisiológicas.

A maior dispersão de eletrólitos e a elevação da peroxidação lipídica foram observadas nas plantas tanto durante o pós-congelamento e após o período de estresse, mas em níveis significativamente maiores na planta controle em comparação com os eventos de transformação testados (Figuras 16, 17), indicando maiores danos às membranas celulares das folhas das plantas controle. A análise de condutividade elétrica é uma medida indireta de danos à membrana celular através do nível de dispersão de íons de discos foliares. Já o MDA é um produto secundário da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, cujo processo é mediado por espécies reativas de oxigênio (ROS), largamente utilizado como

indicador de estresse nas membranas de plantas (Taulavuori *et al.*, 2001). A peroxidação lipídica induz o aumento da permeabilidade de membranas, levando à perda de eletrólitos e funções celulares. Porém, a magnitude dos danos oxidativos difere entre espécies ou genótipos e em resposta à intensidade e duração do estresse (Sgherri *et al.*, 2000). No presente trabalho, as concentrações de MDA nas folhas e a menor dispersão de eletrólitos em discos foliares evidenciaram claramente que as plantas não transformadas de cana-de-açúcar sofreram maiores danos oxidativos nas membranas após serem submetidas ao estresse de frio. Em contrapartida ao efeito da expressão do gene *ipt* no aumento do conteúdo de clorofila nos eventos transgênicos, o estresse de frio aplicado pode danificar o aparelho fotossintético devido a danos nas membranas ou proteínas ligadas à membrana, principalmente nas plantas C4, como a cana-de-açúcar. Em plantas C4, abaixo da temperatura limite (25°C) podem ocorrer danos irreversíveis nas membranas celulares (Treharne e Cooper, 1969 *apud* Du *et al.*, 1999).

A fluorescência de clorofila fornece informações sobre o rendimento quântico e sobre o estado de energia dos cloroplastos (Winter e Demmig, 1987 *apud* Molinari *et al.*, 2006), mesmo que nenhuma fixação de CO₂ ou liberação de O₂ ocorra. Neste caso, *Fv/Fm* está relacionada com a estimativa da disponibilidade de dissipação de energia para o metabolismo de carbono (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1989 *apud* Molinari *et al.*, 2006). Existem evidências de que os efeitos de estresse sobre o fotossistema II (FS II) podem ser ocasionados pela produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, levando à queda na atividade fotossintética (Smirnoff, 1993). Resultados com diferentes variedades de cana-de-açúcar submetidas ao congelamento mostram claramente a redução ou manutenção das taxas fotossintéticas dependendo da variedade testada (Du *et al.*, 1999); especificamente neste trabalho, os parâmetros associados à emissão da fluorescência não diferiram entre os eventos transgênicos e o controle nos diferentes tratamentos, apesar do aumento do conteúdo de clorofila observado nas folhas submetidas ao estresse de frio. Geralmente, altas taxas fotossintéticas são acompanhadas pelo aumento no conteúdo de clorofila e atividade da Rubisco (Dordas e Sioulas, 2008; Evans e Terashima, 1987; Fredeen *et al.*, 1991). Entretanto, em plantas de tabaco transgênicas, concentrações mais elevadas de citocininas nas folhas reduziram a senescência medida pelo conteúdo de clorofila, mas não afetaram as taxas fotossintéticas (Ma e Liu, 2009).

Ainda, a expressão de genes codificadores de enzimas importantes para a manutenção da fotossíntese em plantas C4 já foi descrita em plântulas de cana-de-açúcar expostas ao frio. Em estudos realizados por Nogueira e colaboradores (2003) foram identificadas alterações na expressão de genes codificadores de algumas proteínas, como a poliubiquitina, e de enzimas, como a PPDK (piruvato fosfato diquinase) e a enzima málica NADP-ME a 4°C. A enzima PPDK é considerada uma das enzimas-chave, podendo determinar a sensibilidade ao frio da fotossíntese de cana-de-açúcar (Du *et al.*, 1999). Estes dados podem indicar que as plantas testadas não tenham sofrido estresse de frio severo o suficiente, tanto em relação ao tempo como também à intensidade de exposição das plantas, para causar danos à sua atividade fotoquímica. Nos ensaios realizados por Du e colaboradores (1999), as taxas fotossintéticas de cana-de-açúcar foram medidas após as plantas terem sido submetidas a 10°C por 4, 28 e 52h, e concomitantemente a 30°C, durante estes mesmos intervalos de tempo.

A distribuição de citocininas está envolvida com a regulação da aclimação fotossintética das plantas com relação aos diferentes gradientes de luz (Boonman *et al.*, 2007), além do que a produção deste fitormônio culmina com a proteção de processos bioquímicos associados à fotossíntese e a indução da fotorrespiração durante o estresse hídrico (Rivero *et al.*, 2009). Como muitas das respostas dos estresses de frio e de seca estão interligadas, existe a possibilidade de que as plantas de cana-de-açúcar contendo o cassete *COR15a:ipt*, também culminem com maior proteção do aparato fotossintético durante exposição das plantas ao estresse de frio. Adicionalmente, o resfriamento das raízes também pode acelerar naturalmente o metabolismo de citocininas em brotos (Kudoyarova *et al.*, 1998), protegendo o aparato fotossintético das plantas.

O promotor *COR15a*, utilizado neste trabalho para direcionar a expressão do gene *ipt*, é alvo de fatores de transcrição *CBFs*, que em conjunto direcionam alterações para ajudar as plantas a resistir aos efeitos prejudiciais do frio (Thomashow 1999 *apud* Hall *et al.*, 2009). Os resultados deste trabalho confirmam a hipótese de que a utilização de uma região promotora frio induzida, fusionada ao gene codificador da isopenteniltransferase (*COR15a:ipt*), enzima-chave na biossíntese de citocininas, mostrou-se uma estratégia eficiente para aumentar a tolerância de plantas de cana-de-açúcar a temperaturas mais frias.

6. CONCLUSÕES

Os resultados dos ensaios de senescência e tolerância ao estresse de frio em plantas de cana-de-açúcar transformadas com gene codificador da isopenteniltransferase sob controle do promotor frio-induzido *COR15a* mostraram que:

(i) o protocolo de transformação e regeneração foi eficiente para a obtenção de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB855536 transgênicas;

(ii) a inserção do gene *ipt* de *Agrobacterium tumefaciens* sob controle do promotor frio induzido *AtCOR15a* culminou na redução da senescência induzida por frio, verificada através da manutenção de folhas verdes por período prolongado;

(iii) a modificação na via de biossíntese de citocininas resultou em aumento na tolerância dos eventos a temperaturas de resfriamento e congelamento durante o período estudado;

(iv) medições de citocininas poderiam elucidar o papel desses fitomônios quanto às respostas das plantas transformadas ao estresse de frio;

(v) há necessidade de determinar a tolerância dos eventos em condições de frio mais prolongado, a fim de compreender os processos de tolerância a este estresse, bem como a relação de redução da senescência com o aumento de produção de sacarose nos colmos dessas plantas.

REFERÊNCIAS

AINLEY, W., KEY, J. Regulatable endogenous production of cytokinins up to 'toxic' levels in transgenic plants and plant tissues. **Plant Mol. Biol.**, 22: 13-23, 1993

ALCOPAR (Associação de Produtores de Álcool e açúcar do Estado do Paraná). Disponível em: <<http://www.alcopar.org.br>>. Acesso em: jan. 2010.

ALLEN, D.J.; ORT, D. R. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. **Trends Plant Sci.**, 6: 36-42, 2001.

ARENCEBIA, A.; VAZQUEZ, R.R.; PRIETO, D.L.; TELLEZ, P.; CARMONA, E.R., COEGO, A.; HERNANDEZ, L.; DE LA RIVA, G.A.; SELMAN-HOUSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, 3: 247-255, 1997.

ARENCEBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; TELLEZ, P.; CHAN, M.T.; YU, S.M.; TRUJILLO, L.E.; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* sp) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, 7: 213-222, 1998.

ARENCEBIA, 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. L.) transformation mediated by cell electroporation. **Transgenic Research**, 8: 349-360. 1999.

ARTUS N.N., UEMURA M., STEPONKUS P.L., GILMOUR S.J., LIN C.; THOMASHOW M.F. Constitutive expression of the cold regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 93, 13404–13409, 1996.

ASHIKARI, M.; SAKAKIBARA, H.; LIN, S.; YAMAMOTO, T.; TAKASHI, T.; NISHIMURA, A.; ANGELES, E.R.; QIAN, Q.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. **Science**, 309: 741–745, 2005.

ASNAGHI, C.; PAULET, F.; KAYE, C.; GRIVET, L. HOARAU, J-Y.; TÉLISMART, H.; GIRARD, G.C.; RABOIN, L.M.; RISTERUCCI, A.M.; GRIVET, L.; D'HONT, A. Target mapping of a sugarcane rust resistance gene (*bru1*) using bulked segregant analysis and AFLP markers. **Theor Appl Genet**, 108: 759-764, 2004.

ATICI, O.; NALBANTOGLU, B. Effect of apoplastic proteins on freezing tolerance in leaves. **Phytochemistry**, 50:755-761, 1999.

BAJAJ, S.; JAYAPRAKASH, T.; LI-FREI, L.; HO, T. H. D.; WU, R. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. **Molecular Breeding**, 5: 493-503, 1999.

BAK, S.; FEYEREISEN, R. The involvement of two p450 enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and glucosinolate biosynthesis. **Plant Physiol**, 127:108-118, 2001.

BAKER, N.R.; EAST, T.M.; LONG, S.P. Chilling damage to photosynthesis in young *Zea mays*. **Journal Experimental Botany**, 139: 189-197. 1983.

BAKER S.S.; WILHELM K.S.; THOMASHOW M.F. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has *cis*-acting elements that confer cold, drought and ABA-regulated gene expression. **Plant Molecular Biology**, 24: 701–713, 1994.

BALIBREA LARA, M.E.; GARCIA, M.C.G., FATIMA, T.; EHNEB, R.; LEE, T.K.; PROELS, R.; TANNER, W.; ROITSCH, T. Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. **The Plant Cell**, 16: 1276–1287, 2004.

BARLIER, I.; KOWALCZYK, M.; MARCHANT, A.; LJUNG, K.; BHALERAO, R.; BENNETT, M.; SANDBERG, G.; BELLINI, C. The *sur2* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97: 14819-14824, 2000.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Crit Rev Plant Sci**, 24: 23–58, 2005.

BHALERAO, R. KESKITALO, J.; STERKY, F.; ERLANDSSON, R.; BJÖRKBACKA, H.; BIRVE, S.J.; KARLSSON, J.; GARDESTROM, P.; GUSTAFSSON, P.; LUNDEBERG, J.; JANSSON, S. Gene expression in autumn leaves. **Plant Physiology**, 131: 430–442, 2003.

BIRCH, R. G.; MARETZKI, A. Transformation of sugarcane. In: BAJAJ, Y. P. S., (ed). **Plant protoplasts and genetic engineering**. IV. Biotechnology in agriculture and forestry, Heidelberg: Springer-Verlag; p. 348–360. 1993.

BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane: opportunities and limitations. In: KEATING, B. A.; WILSON, J. R. (eds). **Intensive sugarcane production: meeting the challenge beyond 2000**. Wallingford: CAB International; 1997. p.125–140.

BOONMAN, A.; PRINSEN, E.; GILMER, F.; SCHURR, U.; PEETERS, A.J.M.; VOESENEK, A.C.J.L.; PONS, T.L. Cytokinin import rate as a signal for photosynthetic acclimation to canopy light gradients. **Plant Physiology**, 143: 1841–1852, 2007.

BOWER, R.; BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant J**, 2: 409–416, 1992.

BOWER, R.; ELLIOTT, A. R.; POTIER, B. A. M.; BIRCH, R. G. High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. **Mol. Breed**, 2: 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 of new seeds**, 5: 209-222, 2003.

BRIGGS, S. P.; KOZIEL, M. Engineering new plant traits for commercial markets. **Curr. Opin. Biotechnol.** 9: 233–235; 1998.

BUCHANAN-WOLLASTON, V.; EARL, S.; HARRISON, E.; MATHAS, E.; NAVABPOUR, S.; PAGE, T.; PINK, D. The molecular analysis of leaf senescence – a genomics Approach. **Plant Biotechnology Journal**, 1: 3–22, 2003.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília, DF: Embrapa informação tecnológica, 2004. 307 p.

CHANDLER, P.M.; ROBERTSON, M. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 45: 113–141, 1994.

CHEN, W.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures. **Journal. Exp. Bot**, 39: 251-261, 1988.

CHEN, H.-H.; BRENNER, M.L.; LI, P.H. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. **Plant Physiology**, 71: 362–365, 1983.

CHEN, L.F.O., HWANG, J.Y., CHARNG, Y.Y., SUN, C.W. AND YANG, S.F. Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) with isopentenyltransferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for post-harvest retardation. **Mol. Breed**, 7: 243–257, 2001.

CHEONG, Y.H.; CHANG, H.-S.; GUPTA, R.; WANG, X.; ZHU, T.; LUAN, S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. **Plant Physiology**, 129: 661–677, 2002.

CHERNYAD'EV, I.I. Effect of water stress on the photosynthetic apparatus of plants and the protective role of cytokinins: a review. **Appl Biochem Microbiol**, 41: 115–128, 2005.

CHINNUSAMY, V.; OHTA, M.; KANRAR, S.; LEE, B.H.; HONG, X.; AGARWAL, M.; ZHU, J.K. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. **Genes Dev**, 17:1043-1054, 2003.

CHOWDHURY, M. K. U.; VASIL, I. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and electroporation of protoplasts. **Plant Cell Rep**, 11: 494–498; 1992.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: out. 2009.

COOK, D.; FOWLER, S.; FIEHN, O.; THOMASHOW, M.F. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 101: 15243–15248, 2004.

CUADRADO, A.; ACEVEDO, R.; MORENO DI'AZ DE LA ESPINA, S.; JOUVE, N.; DE LA TORRE, C. Genome remodeling in three modern *S. officinarum* x *S. spontaneum* sugarcane cultivars. **J. Exp. Bot.**, 55: 847–854; 2004.

De ROSA; V.Jr.; NOGUEIRA, F.T.S.; MENOSSI, M.; ULIAN, E.C.; ARRUDA, P. Identification of methyl jasmonate-responsive genes in sugarcane using cDNA arrays. **Braz J Plant Physiol**, 17:173-180, 2005.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J.-C. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Mol. Gen. Genet.** 250:405–413; 1996.

D'HONT, A.; SOUZA, G.M.; MENOSSI, M.; VINCENTZ, M.; VAN-SLYUIS, M-A.; GLASZMANN, J.C.; ULIAN, E. Sugarcane: a major source of sweetness, alcohol and bioenergy.; In: MOORE, P.H.; MING, R. (Org.). **Genomics of Tropical Crop Plants**. New York, U.S.A: Springer, 21: 483-505, 2008.

DORDAS, C.A.; SIOULAS, C. Safflower yield, chlorophyll content, photosynthesis, and water use efficiency response to nitrogen fertilization under rainfed conditions. **Industrial Crops and Products**, 27: 75–85, 2008.

DÖRFFLING, K.; DÖRFFLING, H.; LESSELICH, G.; LUCK, E.; ZIMMERMANN, C.; MELZ, G.; JÜRGENS, H.U. Heritable improvement of frost tolerance in winter wheat by in-vitro-selection of hydroxyproline-resistant proline overproducing mutants. **Plant Molecular Biology**, 23: 221–225. 1997.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15, 1987.

DU, Y.C.; NOSE, A.; WASANO, K. Effects of chilling temperature on photosynthetic rates, photosynthetic enzyme activities and metabolite levels in leaves of three sugarcane species. **Plant, Cell and Environment**, 22: 317-324, 1999.

ELLIOT, A.R.; CAMPBELL, J.A.; BRETTEL, R.I.S.; GROF, C.P.L. *Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. **Australian Journal Plant Physiology**, 25: 739-74. 1998.

ELLIOTT, A. R.; GEIJSKES, R. J.; LAKSHMANAN, P.; MCKEON, M. G.; WANG, L. F.; BERDING, N.; GROF, C. P. L.; SMITH, G. R. Direct regeneration of transgenic sugarcane following microprojectile transformation of regenerable cells in thin transverse section explants. In: VASIL, I. K. (ed.) **Plant Tissue Cult. Biotechnol. Proc. Xth Int. Assoc.**, Orlando, 2002.

ELLIS, J.; DODDS, P.; PRYOR, T. The generation of plant disease resistance gene specificities. **Trends Plant Sci.** 5:373–379; 2000.

EVANS, J.R.; TERASHIMA, I. Effects of nitrogen nutrition on electron transport components and photosynthesis in spinach. **Aust. Plant Physiol.**, 14, 281-292, 1987.

FAO (Food and Agriculture Organization). Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: Jan.2009.

ENRIQUEZ-OBREGON, G.A.; VAZQUEZ-PADRON, R.I.; PRIETO-SAMSONOV, D.L.; DE LA RIVA, G.A.; SELMAN-HOUSEIV. Herbicide resistant sugarcane plants by *Agrobacterium* – mediated transformation. **Planta**, 206: 20-27. 1998.

FAISS, M.; ZALUBILOVA, J.; STRNAD, M.; SCHUMULLING, T. Conditional transgenic expression of the *ipt* genes indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. **Plant J.**, 12: 401-415, 1997.

FALCO, M.; TULMANN, A.; ULIAN, E. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a brazillian sugarcane. **Plant Cell Reports**, 19: 1188-1194, 2000.

FELLER, U.; FISCHER, A. Nitrogen metabolism in senescing leaves. **Crit Rev Plant Sci**, 13: 241–273, 1994.

FRANCIS, D.; BARLOW, P.W. Temperature and cell cycle. **Symp Soc Exp Biol**, 42:181–201, 1988.

FRANKS, T.; BIRCH, R. G. Gene transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. **Aust. J. Plant Physiol**, 18: 471–480; 1991.

FREEDEN, A.L.; GAMON, J.A.; FIELD, C.B. Responses of photosynthesis and carbohydrate partitioning to limitations in nitrogen and water availability in field-grown sunflower. **Plant Cell Environ.**, 14:963-970, 1991.

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J.E. Herbicide resistant sugarcane containing the *bar* gene. **Crop Science**, 36: 1367-1374, 1996.

GAMBLEY, R. L.; FORD, R.; SMITH, G. R. Microprojectile transformation of sugarcane meristems and regeneration of shoots expressing β -glucuronidase. **Plant Cell Rep.**, 12: 343–346; 1993.

GAN, S.; AMASINO M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. **Science**, 270:1986-1988, 1995.

GAN, S.S.; AMASINO, R.M. Making sense of senescence: molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. **Plant Physiol**, 113: 313–319, 1997.

GASCHO, G.J.; SHIN, S.F. Sugarcane. In: TEARE, I.D.; PEET, M.M. (Ed.). **Crop-Water relations**. New York: John Wiley, p.445-479, 1983.

GIMÉNEZ-ABIÁN, M.I.; ROZALÉN, A.E.; CARBALLO, J.A.; BOTELLA, L.M.; PINCHEIRA, J.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F.; DE LA TORREL, C. *HSP90* and checkpoint-

dependent lengthening of the G2 phase observed in plant cells under hypoxia and cold. **Protoplasma**, 223:191–196, 2004.

GIULINI, A.; WANG, J.; JACKSON, D. Control of phyllotaxy by the cytokinin-inducible response regulator homologue ABPHYL1. **Nature**, 430: 1031–1034, 2004.

GROVER, A.; KAPOUR, A.; LAKSHMI, O.S.; AGARVAL, S.; SAHI, C.; KATIYAR-AGARWAL, S.; AGARWAL, M.; DUBEY H. Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. **Current Science**, 80 (2): 206-214, 2001.

HALL, J.D.; COBB, J.; IQBAL, M.; ABIDALI, M.; LIU, Z.; MOUNT, D.W. *UVH6*, a plant homolog of the human/yeast *TFIIH* transcription factor subunit XPD/RAD3, regulates cold-stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol. Biol. Rep.**, 27:217–228, 2009.

HANLON, D.; MACMAHON, G. G.; MCGUIRE, P.; BEATTIE, R. N.; STRINGER, J. K. Managing low sugar prices on farms – short term and long term strategies. In: HOGARTH, D. M. (Ed.) **Proc. Aust. Soc. Sugarcane Technol.**, 22:1–8; 2000.

HARE, P.D.; VAN STADEN, J. The molecular basis of cytokinin action. **Plant Growth Regul**, 23: 41–78, 1997a.

HARE, P.D; CRESS, W.A.; VAN STADEN, J. The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. **Plant Growth Regulation**, 23: 79–103, 1997b.

HE, Y.; GAN, S. Molecular characteristics of leaf senescence. **Recent Research Developments in Plant Molecular Biology**, 1: 1–17, 2003.

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

HENSEL, L.L.; GRBIĆ, V.; BAUMGARTEN, D.A.; BLEECKER, A.B. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 5: 553–564, 1993.

HIGUCHI, M.; PISCHKE, M.S.; MAHONEN, A.P. In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. **Proceedings of National Academy of Sciences U S A**, 101: 8821–8826, 2004.

HIMELBLAU, E.; AMASINO, R.M. Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. **Journal of Plant Physiology**, 158: 1317–1323, 2001.

HIROSE, N.; TAKEI, K.; KUROAH, T.; Kamada-Nobusada, T.; Hayashi, H.; Sakakibara, H. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. **Journal of Experimental Botany**, 59 (1): 75–83, 2008.

HOCH, W.A.; ZELDIN, E.L.; MCCOWN, B.H. Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence. **Tree Physiol**, 21: 1–8, 2001.

HOLMSTRÖM, K.O.; SOMERSALO, S.; MANDAL, A.; PALVA, T.E.; WELIN, B. Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine 51:177-185, 2000.

HORTENSTEINER, S.; FELLER, U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. **Journal of Experimental Botany**, 53: 927–937, 2002.

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

HU, Y.; JIA, W.; WANG, J.; ZHANG, Y.; YANG, L.; LIN, Z. Transgenic tall fescue containing the *Agrobacterium tumefaciens ipt* gene shows enhanced cold tolerance. **Plant Cell Rep.**, 23: 705-709, 2005.

HULL, A.K.; VIJ, R., CELENZA, J.L. *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97: 2379-2384, 2000.

IBA, K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, 53:225-245, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: jan. 2010.

INGELBRECHT, I. L.; IRVINE, J. E.; MIRKOV, T.E. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiol.**, 119: 1187–1197; 1999.

IRVINE, J. E.; MIRKOV, T. E. The development of genetic transformation of sugarcane in Texas. **Sugar J.**, 60: 25–29; 1997.

JAGLO, K.C.; SUSANNE KLEFF, S.; AMUNDSEN, K.L.; ZHANG, X.; HAAKE, V.; ZHANG, J. Z.; DEITS, T.; THOMASHOW, M.F. Components of the *Arabidopsis* c-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *brassica napus* and other plant species. **Plant Physiology**, 127: 910–917, 2001.

JAGLO-OTTOSEN, K.R.; GILMOUR, S.J.; ZARKA, D.G.; SCHABENBERGER, O.; THOMASHOW, M.F. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. **Science**, 280: 104–106, 1998.

JAMES, C. **Relatório 35: Situação global das lavouras GM (GM) comercializadas: 2006**. Rio de Janeiro: International Service for the acquisition of agri-biotech applications, 2006. 107p.

JORDI, W.; SCHAPENDONK, A.; DAVELAAR, E. STOOPEN, G.M.; POT, C.S.; DE VISSER, C.R.; VAN RHIJN, J.A.; GAN, S.; AMASINO, R. Increased cytokinin levels in transgenic pSAG12-*ipt* tobacco plant have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. **Plant Cell Env**, 23: 279-289, 2000.

KAUP, M.T.; FROESE, C.D.; THOMPSON, J.E. A role of diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. **Plant Physiol**, 129: 1616-1626, 2002.

KAWASAKI, S.; BORCHERT, C.; DEYHOLOS, M.; WANG, H.; BRAZILLE, S.; KAWAI, K.; GALBRAITH D.; BOHNERT, H.J. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. **Plant Cell**, 13:889-905, 2001.

KHODAKOVSKAYA, M.; LI, Y.; VANKOVA, R.; MALBECK, J.; McAVOY, R. Effects of *cor15a-ipt* gene expression on leaf senescence in transgenic *Petunia x hybrida* and *Dendranthema x grandiflorum*. **Journal of Experimental Botany**, 56: 1165-1175, 2005.

KHODAKOVSKAYA, M.; McAVOY, R.; PETERS, J.; WU, H.; LI, Y. Enhanced cold tolerance in transgenic tobacco expressing a chloroplast Δ^3 fatty acid desaturase gene under the control of a cold-inducible promoter. **Planta**, 223: 1090–1100, 2006.

KIEBER, J. **The Arabidopsis Book**. In: Cytokinins, pp 2-25. 2002.

KIM, H.J.; RYU, H.; HONG, S. H.; WOO, H. R.; LIM, P. O.; LEE, I. C.; SHEEN, J.; NAM, H.G.; HWANG, I. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by *AHK3* through phosphorylation of *ARR2* in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, 103 (3): 814-819, 2006.

KISHOR, P.B.K.; HONG, Z.; MIAO, G.; HU, C-A.A.; VERMA, D.P.S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline overproduction and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, 108: 1387-1394, 1995.

KLEE, H. Transgenic plants and cytokinin biology. In: MOK, D.; MOK, M. (ed) **Cytokinins: Chemistry, Action and Function**. CRC Press, Boca Raton, FLA, pp 289-293, 1994.

KRATSCH, H.A.; WISE, R.R. The ultrastructure of chilling stress. **Plant, Cell and Envirom**, 23: 337-350, 2000.

KROMDIJK, J.; SCHEPERS, H.E.; ALBANITO, F.; FITTON, N.; CARROLL, F.; JONES, M.B.; FINNAN, J.; LANIGAN, G.J.; GRIFFITHS, H. Bundle sheath leakiness and light limitation during C4 leaf and canopy CO2 uptake. **Plant Physiology**, 148: 2144–2155, 2008.

KUDOYAROVA, G.R.; FARHUTDINOV, R.G.; MITRICHENKO, A.N. ; TEPLOVA, I.R.; DEDOV, A.V.; VESELOV, S.U.; KULAEVA, O.N. Fast changes in growth rate and cytokinin content of the shoot following rapid cooling of roots of wheat seedling. **Plant Growth Regulation**, 26: 105–108, 1998.

KURAKAWA, T.; UEDA, N.; MAEKAWA, M.; KOBAYASHI, K.; KOJIMA, M.; NAGATO, Y.; SAKAKIBARA, H.; KYOZUKA, J. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. **Nature**, 445: 652–655, 2007.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; ELLIOTT, A. R.; WANG, L. F.; MCKEON, M. G.; SWAIN, R. S.; BORG, Z.; BERDING, N.; GROF, C. P. L.; SMITH, G. R. Direct regeneration tissue culture and transformation systems for sugarcane and other monocot species. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Mol. Biol. Workshop**, Montpellier 4:25; 2003.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; GROF, C. L. P.; BONNETT, G. D.; SMITH, G. R.. Invited review: sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant**, 41:345–363, 2005.

LAST, D. I.; BRETTELL, R. I. S.; CHAMBERLAIN, D. A.; CHAUDHURY, A. M.; LARKIN, P. J.; MARSH, E. L.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. pEmu : An improved promoter for gene expression in cereal cells. **Theor Appl Genet**, 82: 582-588, 1991.

LEE, R.-H.; CHEN, S.-C.G. Programmed cell death during rice leaf senescence is nonapoptotic. **New Phytologist**, 155: 25–32, 2002.

LEIBBRANDT, N. B.; SNYMAN, S. J. Stability of gene expression and agronomic performance of a transgenic herbicide-resistant sugarcane line in South Africa. **Crop Science**, 43: 671-677. 2003.

LEIBFRIED, A.; TO, J. P.; BUSCH, W.; STEHLING, S.; KEHLE, A.; DEMAR, M.; KIEBER, J. J.; LOHMANN, J. U. WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. **Nature**, 438: 1172–1175, 2005.

LESSARD, P. A.; KULAVEERASINGAM, H.; YORK, G. M.; STRONG, A.; SINSKEY, A. J. Manipulation gene expression for the metabolic engineering of plants. **Metabolic Engineering**, 4: 67-79, 2002.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, **Methods Enzymol**, 148, 350–382, 1987.

LIM, P. O. K.; KIM, H. J.; Nam, H. G. Leaf senescence. *Ann Rev Plant Biol*, 58: 115-136, 2007.

LUO, Y. Y.; GIANFAGNA, H. W.; JANES, B.; HUANG, B.; WANG, Z.; XING, J. Expression of the *ipt* gene with the *AGPase S1* promoter in tomato results in unbranched roots and delayed leaf senescence. **Plant Growth Regulation**, 47: 47-57, 2005.

LYCUMS, E. Cold tolerant sugarcane. Thermal characteristics of C4 photosynthetic enzymes from leaves of three sugarcane species differing in cold sensitivity. **Agricultural research**, 26: 298-304, 1999.

LYNCH, D. V.; STEPONKUS P. L. Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale L. cv Puma*). **Plant Physiology**, 83: 761–767, 1987.

MA, Q.H.; LIU, Y.C. Expression of isopentenyl transferase gene (*ipt*) in leaf and stem delayed leaf senescence without affecting root growth. **Plant Cell Rep**, 28:1759–1765, 2009.

MARETZKI, A.; SUN, S. S.; NAGAI, C.; BIDNEY, D.; HOUTCHENS, K. A.; DELA CRUZ, A. Development of a transformation system for sugarcane. **VII Int. Congr. Plant Tiss. Cell Cult.** Amsterdam 68; 1990.

MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; KASUGA, M.; ITO, Y.; SEKI, M.; GODA, H.; SHIMADA, Y.; YOSHIDA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. **Plant J.**, 38: 982–993, 2004.

MASCLAUX, C.; VALADIER, M.H.; BRUGIÈRE, N.; MOROT-GAUDRY, J.F.; HIREL, B. Characterization of the sink /source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. **Planta**, 211: 510–518, 2000.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; VALADIER, M.H.; CARRAYOL, E.; REISDORF-CREN, M.; HIREL, B. Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. **Plant, Cell & Environment**, 25: 1451–1462, 2002.

MCCABE, M.S.; GARRAT, L.C.; SCHEPERS, F.; JORDI, W.J.R.; STOOPEN, G.M.; DAVELAAR, E.; VAN RHIJN, H.A.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Effects of P^{SAG12}-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. **Plant Physiology**, 127: 505-516. 2001.

MCGRAW, B.A.; BURCH, L.R. Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: PJ DAVIES (ed). **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Ed. 2. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. pp 98-117.
MCKENZIE, M.J.; METT, V.; REYNOLDS, P.H.S.; JAMESON P. Controlled cytokinin production in transgenic tobacco using a copper-inducible promoter. **Plant Physiol**, 116: 969-977, 1998.

MCQUALTER, R.B.; DALE, J.L.; HARDING, R.M.; MCMARON, J.A.; SMITH, G.R. Production and evaluation of transgenic sugarcane containing a Fiji disease virus (FDV) genome segment S9-derived synthetic resistance gene. **Australian Journal of Agric Res**, 55: 139-145. 2004.

MEDFORD, J.I.; HORGAN, R.; EL-SAWI, Z.; KLEE, H.J. Alternations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. **Plant Cell**, 1: 403-413, 1989.

MELOTTO-PASSARIN, D.M. **Transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e *Agrobacterium tumefaciens* visando estudar o mecanismo de morte celular programada**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo.

MIKKELSEN, M.D.; NAUR, P.; HALKIER, B.A. *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. **Plant J**, 37: 770-777, 2004.

MILLER, A.; TSAI, C.H.; HEMPHILL, D.; ENDRES, M.; RODERMEL, S.; SPALDING, M. Elevated CO₂ effects during leaf ontogeny - A new perspective on acclimation. **Plant Physiology**, 115: 1195–1200, 1997.

MING, R.; MOORE, P.H.; WU, K-K.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.; THEW, T.L. Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. **Plant Breeding Reviews**, 27: 15-118, 2006.

MOK, D.W.; MOK, M.C. Cytokinin metabolism and action. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 52: 89–118, 2001.

MOLINARI, H.B. **Expressão estresse-induzida do gene *p5cs* em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico**. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia). Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

MOLINARI, H.B.; 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. 218-229. 2007.

MONROY, A.F.; DHINDSA, R.S. Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 degrees C. **Plant Cell**, 7: 321–331, 1995.

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

NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. **Plant Physiology**, 149: 88–95, 2009.

NAKAYAMA, K.; OKAWA, K.; KAKIZAKI, T.; HONMA, T.; ITOH, H.; INABA, T. *Arabidopsis* cor15am is a chloroplast stromal protein that has cryoprotective activity and forms oligomers. **Plant Physiology**, 144: 513-523, 2007.

NIE, G.Y.; LONG, S.P.; GARCIA, R.L.; KIMBALL, B.A.; LAMORTE, R.L.; PINTER, P.J.; WALL, G.W.; WEBBER, A.N. Effects of free-air CO₂ enrichment on the development of the photosynthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf proteins. **Plant, Cell & Environment**, 18: 855–864, 1995.

NOGUEIRA, F.T.S.; DE ROSA, V.E.; MENOSSI, M.; ULIAN, E.C.; ARRUDA, P. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiol**, 132:1811-1824, 2003.

NOODEN, L.D.; SINGH, S.; LETHAM, D.S. Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean. **Plant Physiol.** 93: 33-39. 1990.

NOODEN, L.D.; GUIAMET, J.J.; JOHN, I. Senescence mechanisms. **Physiol Plant**, 101: 746–753, 1997.

NUTT, K. A.; ALLSOPP, P. G.; MCGHIE, T. K.; SHEPHERD, K. M.; JOYCE, P. A.; TAYLOR, G. O.; MCQUALTER, R. B.; SMITH, G. R. Transgenic sugarcane with increased resistance to canegrubs. In: Hogarth, D. M., ed. **Proc. Aust. Soc. Sugarcane Technol.**, 21: 171–176; 1999.

OBREGON, G.A.; VAZQUEZ-PADRON, R.I.; PRIETO-SAMSONOV, D.L.; DE LA RIVA, G.A.; SELMAN-HOUSEIV. Herbicide resistant sugarcane plants by *Agrobacterium* – mediated transformation. **Planta**, 206: 20-27. 1998.

ONO, K.; NISHI, Y.; WATANABE, A.; TERASHIMA, I. Possible mechanisms of adaptative leaf senescence. **Plant Biol**, 3: 234-243. 2001.

OONO, Y.; SEKI, M.; NANJO, T.; NARUSAKA, M.; FUJITA, M.; SATOH, R.; SATOU, M.; SAKURAI, T.; ISHIDA, J.; AKIYAMA, K.; IIDA, K.; MARUYAMA, K.; SATOH, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression profiles during rehydration process after dehydration using ca 7,000 full-length cDNA microarray. **Plant J**, 34:868-887, 2003.

OONO, Y.; SEKI, M.; SATOU, M.; IIDA, K.; AKIYAMA, K.; SAKURAI, T.; FUJITA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI K. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* genes during cold acclimation and deacclimation using DNA microarrays. **Funct Integr Genomics**, 4:1-23, 2006.

PARVANOVA, D.; POPOVA, A.; ZAHARIEVA, I.; LAMBREV, P.; KONSTANTINOVA, T.; TANEVA, S.; ATANASSOV, A.; GOLTSEV, V.; DJILIANOV, D. Low temperature tolerance of tobacco plants transformed to accumulate proline, fructans, or glycine betaine. Variable chlorophyll fluorescence evidence. **Photosynthetica**, 42: 179-185, 2004.

PAUL, M.J.; FOYER, C.H. Sink regulation of photosynthesis. **J Exp Bot.**, 52: 1383-1400, 2001.

RAI, M.; HE, C.; WU, R. Comparative functional analysis of three abiotic stress-inducible promoters in transgenic rice. **Transgenic Res**, 18:787–799, 2009.

RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. Biobalística. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF, Embrapa/SPI, 1998.

RIVERO, R.M.; KOJIMA, M.; GEPSTEIN, A.; SAKAKIBARA, A.; MITLER, R. GEPSTEIN, S.; BLUMWALD, E. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 104 (49): 19631-19636. 2007.

RIVERO, R.M.; SHULAEV, V.; BLUMWALD, E. Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. **Plant Physiology**, 150: 1530–1540, 2009.

RIZHSKY, L.; HALLAK-HERR, E.; VAN BREUSEGEM, F.; RACHMILEVITCH, S.; BARR, J.E.; RODERMEL, S.; INZE, D.; MITTLER, R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. **The Plant Journal**, 32: 329–342, 2002.

ROBINSON, S.J.; PARKIN, I.J.P. Differential SAGE analysis in Arabidopsis uncovers increased transcriptome complexity in response to low temperature. **BMC Genomics**, 9 (434): 1-17, 2008.

ROCHA, F.R.; PAPIZI-TERZI, F.S.; NISHIYAMA Jr, M.Y.; VÊNIO, R.Z.N.; VICENTINI, R.; DUARTE, R.D.C.; de ROSA, V.E.; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A.H.; RODRIGUES, F.A.; ULIAN, E.C.; ZINGARETTI, S.M. GALBIATTI, J.A.; ALMEIDA, R.S.; FIGUEIRA, V.O.; HEMERLY, A.S.; SILVA-FILHO, M.C.S.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC genomics**, 8 (71): 1-22, 2007.

ROLLAND, F.; MOORE, B.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants. **Plant Cell**, 14: 185-205. 2002.

RYMEN, B.; FIORANI, F.; KARTL, F.; VANDEPOELE, K.; INZÉ, D.; BEEMASTER, G.T.S. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. **Plant Physiol**, 143:1429–1438, 2007.

RYU, S.B.; COSTA, A.; XIN, Z.; LI, P.H. Induction of cold hardiness by salt stress involves synthesis of cold- and abscisic acid-responsive proteins in potato (*Solanum commersonii* Dun.). **Plant Cell Physiol**, 36: 1245–1251, 1995.

SAIRAM, R.K.; RAO VEERABHADRA, K.; SRIVATAVA, G.C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science**, 163:1037-1046, 2002.

SAKAKIBARA, H. Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: DAVIES, P.J. (ed). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!**. Kluwer Academic Publishers, USA, 3.ed., 3: 95-114, 2004.

SAKAKIBARA, H.; KASAHARA, H.; UEDA, N.; KOJIMA, M.; TAKEI, K.; HYSHIYAMA, S.; ASAMI, T.; OKADA, K.; KAMIYA, Y.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, S. *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, 102: 9972–9977, 2005.

SAKAKIBARA H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. **Annual Review of Plant Biology**, 57: 431–449, 2006.

SANFORD, J.C.; KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science Technology**, 5: 27-37, 1987.

SANFORD, J.C. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, 79: 206-209, 1990.

SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSELL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzymology**, 217: 483-509, 1993.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 97:11655-11660, 2000.

SCHMULLING, T.; WERNER, T.; RIEFLER, M.; KRUPKOVA, E.; MANNS, I.B.Y. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. **Journal of Plant Research**, 116: 241–252, 2003.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ABE, H.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. **Plant Cell**, 13: 61–72, 2001.

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 in Biotechnology**, 14: 194-199, 2003.

SEVERO, J. R. (2009). Cana-de-açúcar: autogestão é alternativa para a falta de políticas públicas. Disponível em: <<http://www.cna.org.br/site/noticia.php?n=1409>>. Acesso em: fev. 2009.

SGHERRI, C. L. M.; MAFFEI, M.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. **Journal Plant Physiology**, 157: 273-279, 2000.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, 3:217-223, 2000.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Curr Opin Plant Biol.**, 6: 410–417. 2003

SIGURDSSON, B.D. Elevated [CO₂] and nutrient status modified leaf phenology and growth rhythm of young *Populus trichocarpa* trees in a 3-year field study. **Trees**, 15: 403–413, 2001.

SMART, C.M.; SCOFIELD, S.R.; BEVAN, M.W.; DYER, T.A. Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. **Plant Cell**, 3: 647-656, 1991.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytol.**, 125:27-58, 1993.

SNYMAN, S.J.; MEYER, G.M.; RICHARDS, J.M.; HARICHARAN, N.; RAMGAREEB, S.; HUCKETT, B. I. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Rep**, 25: 1016-1023, 2006.

SOLANKE, A.U.; SHARMA, A.K. Signal transduction during cold stress in plants. **Physiol Mol Biol Plants**, 14 (1-2): 69-79, 2008.

STEPONKUS, P.L.; WEBB, M.S. Freeze-induced dehydration and membrane destabilization in plants. In: SOMERO, G.; OSMOND, B. (eds). **Water and Life: Comparative Analysis of Water Relationships at the Organismic, Cellular and molecular Level**. Springer-Verlag, Berlin, pp 338–362, 1992.

STEPONKUS P.L., UEMURA M., JOSEPH R.A., GILMOUR S.J.; THOMASHOW M.F. Mode of action of the *COR15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 95: 14570–14575, 1998.

SU, J.; SHEN, Q.; HO, T-H.D.; WU, R. Dehydration-stress-regulated transgene expression in stably transformed rice plants. **Plant Physiology**, 117: 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**, 166: 941-948, 2004.

TABAEI-AGHDAEI, S.R.; PEARCE, R.S.; HARRISON, P. Sugars regulate cold-induced gene expression and freezing tolerance in barley cell cultures. **Journal of Experimental Botany**, 54:1565-1575, 2003.

TAI, P.Y.P. Freezing cold-tolerant parental clones of sugarcane. **Agronomy Journal**, 73: 423-426. 1981.

TAI, P.Y.P.; LENTINI, R.S. Freeze damage of Florida sugarcane. In: Anderson DL (Ed) **Sugarcane Handbook**, Ed.1, Florida Cooperative Extension. 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3 ed. Ed Artmed, Porto Alegre, RS, 2004.

TAKEI, K.; YAMAYA, T.; SAKAKIBARA H. *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. **Journal of Biological Chemistry**, 279: 41866–41872, 2004.

TANAKA, M.; TAKEI, K.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; MORI, H. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. **The Plant Journal**, 45: 1028–1036, 2006.

TAO, D.L.; OQUIST G.; WINGSLE, G. Active oxygen scavengers during cold acclimation of scots pine seedlings in relation to freezing tolerance. **Cryobiology**, 37: 38–45, 1998.

TAULAVUORI, E.; HELLSTROM, E.-K.; TAULAVUORI, K.; LAINE, K. Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillos* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. **Journal of Experimental Botany**, 52 (365): 2375-2380, 2001.

TAYA, Y., TANAKA, Y., NISHIMURA, S. 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoïdum*. **Nature**, 271: 545-547, 1978.

THOMAS, H.; SMART, C.M. Crops that stay green. **Ann appl Biol**, 123:193-219, 1993.

THOMAS, H.; OUGHAM, H.J.; WAGSTAFF, C.; STEAD, A.D. Defining senescence and death. **Journal of Experimental Botany**, 54: 1127–1132, 2003.

THOMASHOW, M.F. *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. In: MEYEROWITZ, E.; SOMERVILLE, C. (eds). **Arabidopsis**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 807–834. 1994.
THOMASHOW, M. F. Role of cold responsive genes in plant freezing tolerance. **Plant Physiology**, 118:1-7, 1998.

THOMASHOW, M. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! **Plant Physiol**, 125: 89-93, 2001.

THOMPSON, J.E.; FROESE, C.D.; MADEY, E.; SMITH, M.D.; HONG, Y. Lipid metabolism during plant senescence. **Prog Lipid Res.**, 37: 119-141, 1998.

TO, J.P.C.; HABERER, G.; FERREIRA, F.J.; DERUERE, J.; MASON, M.G.; SCHALLER, G.E.; ALONSO, J.M.; ECKER, J.R.; KIEBER, J.J. Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. **Plant Cell**, 16: 658–671, 2004.

TO, J.P.C.; KIEBER, J.J. Cytokinin signaling: two –components and more. **Trends in Plant Science**, 13 (2), 85-92, 2007.

UEMURA M., JOSEPH R.A.; STEPONKUS P.L. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). **Plant Physiology**, 109: 15–30, 1995.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. Disponível em: <www.unica.com.br>. Acesso em: Fev. 2010.

Van HEERDEN, P.D.R.; RAMBURAN, S.; VAN ANTWERPEN, T. Varietal differences in cold acclimation potential in sugarcane influences stalk sucrose accumulation following frost. **South African Journal of Botany**, 75 (2): 425. 2009.

VERSLUES, E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J.-K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, 45: 523-539, 2006.

VESELOVA, S.V.; FARHUTDINOV, R.G.G.; VESELOV, S.Y.; KUDOYAROVA, G.R.; VESELOV, D.S.; HARTUNG, W. The effect of root cooling on hormone content, leaf conductance and root hydraulic conductivity of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L.). **J Plant Physiol**, 162:21–26, 2005.

VESELOVA, S.V.; FARKHUTDINOV, R.G.; VESELOV, D.S.; KUDOYAROVA, G.R. Role of cytokinins in the regulation of stomatal conductance of wheat seedlings under conditions of rapidly changing local temperature. **Russ J Plant Physiol**, 53: 756–761, 2006.

VICKERS, J.E.; GROF, C.P.L.; BONNET, G.D.; JACKSON, P.A.; KNIGHT, D.P.; ROBERTS, S.E.; ROBINSON, S.P. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic sugarcane results in darker juice and raw sugar. **Crop Science**, 45: 354-362. 2005.

VOGEL, J.T.; ZARKA, D.G.; VAN BUSKIRK, H.A.; FOWLER, S.G.; THOMASHOW, M.F. Roles of the *CBF2* and *ZAT12* transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. **Plant J.**, 41: 195–211, 2005.

WANG, J.; LETHAM, D.S.; CORNISH, E.; WEI, K.; HOCART, C.H.; MICHAEL, M.; STEVENSON, K.R. Studies of cytokinin action and metabolism using tobacco plants expressing either the *ipt* or *gus* gene controlled by a chalcone synthase promoter: II *ipt* and *gus* gene expression, cytokinin levels and metabolism. **Australian Plant Physiology**, 24: 73-683. 1997.

WANG, M.L.; GOLDSTEIN, C.; SU, MOORE, P.H.; ALBERT, H.H. Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory. **Transgenic Research**, 14: 167-178. 2005.

WEAVER, L.M.; AMASINO, R.M. Senescence is induced in individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. **Plant Physiology**, 127: 876-886, 2001.

WEBB, M.S.; UEMURA, M.; STEPONKUS, P.L. A comparison of freezing injury in oat and rye: two cereals at the extremes of freezing tolerance. **Plant Physiology**, 104: 467–478, 1994.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; STRNAD, M.; SCHMULLING, T. Regulation of plant growth by cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, 98: 10487–10492, 2001.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMULLING, T. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. **The Plant Cell**, 15: 2532–2550, 2003.

WERNER, T.; KOLLMER, I.; BARTRINA, I.; HOLST, K.; SCHMULLING, T. New insights into the biology of cytokinin degradation. **Plant Biology**, 8: 371–381, 2006.

WERNER, T.; SCHMULLING, T. Cytokinin action in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, 12:527–538, 2009.

WINGLER, A.; VON SCHAEWEN, A.; LEEGOOD, R.C.; LEA, P.J.; QUICK, W.P. Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. **Planta**, 116: 329–335, 1998.

WINGLER, A.; MARÈS, M.; POURTAU, N. Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. **New Phytologist**, 161: 781–789, Blackwell Publishing, Ltd. 2004.

WINGLER, A.; BROWNHILL, E.; POURTAU, N. Mechanisms of the light-dependent induction of cell death in tobacco plants with delayed senescence. **Journal of Experimental Botany**, 56(421): 2897–2905, 2005.

WINGLER, A.; PURDY, S.; MACLEAN, J.A.; POURTAU, N. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, 57 (2): 391–399, 2006.

WU, L.; BIRCH, R.G. Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. **Plant Biotechnology Journal**, 5:109–117, 2007.

XIA, J.; ZHAO, H.; LIU, W.; LI, L.; HE, Y. Role of cytokinin and salicylic acid in plant growth at low temperatures. **Plant Growth Regulation**, 57 (3): 211–221, 2009.

XIN, Z.; BROWSE, J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. **Plant, Cell and Environment**, 23: 893–902, 2000.

XIONG, L.; ISHITANI, M.; LEE, H.; ZHU, J.K. The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. **Plant Cell**, 13: 2063–2083, 2001.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K.S.; ZHU, J.K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **Plant Cell (Suppl)** 14: 165–183, 2002.

YARONSKAYA, E.; VERSHILOVSKAYA, I.; POERS, Y.; ALAWADY, A.E.; AVERINA, N.; GRIMM, B. Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. **Planta**, 224: 700–709, 2006.

YOSHIDA, S. Molecular regulation of leaf senescence. **Current Opinion in Plant Biotechnology**, 6: 79–84, 2003.

ZHANG, L.; XU, J.; BIRCH, R.G. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. **Nature Biotechnology**, 17: 1021-1024, 1999.

ZHANG, J., CAN TOAI, T., HUYNH, L. AND PRISZNER, J. Development of flooding-tolerant *Arabidopsis thaliana* by autoregulated cytokinin production. **Mol. Breed**, 6: 135–144, 2000.

ZHANG, M.Q.; ZHENG, X.F.; YU, A.L.; SHENG, J.; ZHOU, H. Molecular marker application in sugarcane. **Sugar Tech**, 6: 251-259, 2004.

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 of Integrative Plant Biology**, 48 (4): 453–459, 2006.

ZHAO, Y.; CHRISTENSEN, S.K.; FANKHAUSER, C.; CASHMAN, J.R.; COHEN, J.D.; WEIGEL, D.; CHORY, J. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. **Science**, 291: 306-309, 2001.

ZHAO, Y.; HULL AK, GUPTA NR, GOSS KA, ALONSO J, ECKER JR, NORMANLY J, CHORY J, CELENZA JL. Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s *CYP79B2* and *CYP79B3*. **Genes Dev**, 16: 3100-3112, 2002.

ZHAO, Y. The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, 11: 1–7, 2007.

ZHU, B.; SU, J.; CHANG, M.C.; VERMA, D.P.S.; FAN, Y.L.; WU, R. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt-stress in transgenic rice. **Plant Science**, 139: 41-48, 1998.

ZUBO, Y.O.; YAMBURENKO, M.A.; SELIVANKINA, S.Y.; SHAKIROVA, F.M.; AVALBAEV, A.M.; KUDRYAKOVA, N.V.; ZUBKOVA, N.K.; LIERE, L.; KULAEVA, O.N.; KUSNETSOV, V.V.; BOËRNER, T. Cytokinin stimulates chloroplast transcription in detached barley leaves. **Plant Physiology**, 148: 1082–1093, 2008.

ZUBKO, E.; ADAM, C.J.; MACHAEKOVA, I.; MALBECK, J.; SCOLLAN, C.; MEYER, P. Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. **Plant J.**, 29: 797-808, 2002.