



RAFAELA RIBEIRO REIS

**PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRANS-
FORMADAS COM *ZmRab17::AtDREB2A* CA PA-
RA TOLERÂNCIA À SECA**

LAVRAS – MG

2013

RAFAELA RIBEIRO REIS

**PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRANSFORMADAS COM
ZmRab17::AtDREB2A CA PARA TOLERÂNCIA À SECA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre

Orientador

Dr. Antônio Chalfun Júnior

Coorientador

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Reis, Rafaela Ribeiro.

Plantas de cana-de-açúcar transformadas com
ZmRab17::AtDREB2A CA para tolerância a seca / Rafaela Ribeiro
Reis. – Lavras : UFLA, 2013.

126 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Antonio Chalfun Júnior.

Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar - Tolerância a seca. 2. *Rhizotron*. 3. Plantas
transgênicas. 4. Cana-de-açúcar - Gene *AtDREB2A CA*. 5. Estresses
abióticos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

RAFAELA RIBEIRO REIS

**PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRANSFORMADAS COM
ZmRab17::AtDREB2A CA PARA TOLERÂNCIA À SECA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 26 de julho de 2013.

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari Embrapa Agroenergia

Dr. Adilson Kenji Kobayashi Embrapa Agroenergia

Dr. Carlos Antônio Ferreira de Sousa Embrapa Agroenergia

Dr. Antônio Chalfun Júnior
Orientador

LAVRAS – MG

2013

Aos meus pais que são a estrutura e a essência do meu ser. Aqueles que sempre apoiaram e dedicaram suas vidas ao amor concebido em forma de gente... Um humano...Tão sublime, inspirador!

OFEREÇO

A Deus, pela graça em ter me permitido existir em toda a plenitude de uma vida de intenso e gratificante aprendizado...

Ele, que em toda a sua bondade esculpiu detalhadamente a beleza que nos cerca e permitiu inebriarmos com tal, incomparáveis em sua essência, inconfundíveis em sua individualidade, cada ser é único...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela implacável força e impulso de fé que sempre contemplou meu ser em todos os momentos.

Ao grande e honroso homem, o qual foi inspiração de conhecimento a inúmeros mestrandos, doutorandos e que hoje Ph.Ds, ainda, relembram os tempos em que ele, na sua humildade acadêmica e humana, apresentou o mundo da ciência como um legítimo professor na arte de ensinar e construir doutores. Esta dissertação é inteiramente em sua homenagem, agradeço-lhe pela motivação e ser eternamente o meu principal pilar e exemplo em todas as amplitudes. Obrigada, meu pai (Miguel)!

À minha mãe, Beatriz, pelo amor e dedicação inalcançáveis, insubstituíveis! Por me apoiar nos momentos difíceis e sempre ter um gesto de carinho e motivação.

Aos meus familiares, Dinha (Virgínia) e irmão Osiris, que nunca saíram dos meus pensamentos. A cada chegada uma expectativa e uma promessa de uma surpresa mineira.

Ao Jean, meu companheiro, amor e amigo em todos os momentos, que me ergueu no mais alto patamar quando fraquejei. Nos momentos de tristeza e decepções me alegrava e fazia cada instante ser especial. Foi o oxigênio que me moveu até aqui, pois pensei em desistir. Isso tudo, eterno cúmplice, só foi possível por seu apoio incondicional e luta ao meu lado.

À Vilma e Pio pela confiança e apoio quando tudo começou.

À Terê, João e Lígia pelas palavras de conforto, esperança e fé nos momentos difíceis.

Às velhas e boas amigas (As + +), amigos da FUNED, PUC inesquecíveis que, mesmo longe, estão sempre presentes em minhas memórias.

Às novas amigas, Valquíria, Tati, Fernanda que compartilharam os anseios de um futuro brilhante, lutando contra todos os empecilhos e desafios do mundo da pesquisa e distância dos entes queridos. Mas que acima de tudo me proporcionaram muita alegria e experiência de vida.

A todos da Biotecnologia, em destaque para Patrick, Evellyn e Marcelo, os quais dividiram comigo a experiência de um mundo novo, a Pós-graduação na UFLA, as lembranças do dia em que nos conhecemos, trabalhos em grupo e, claro, os momentos de descontração nunca sairão da minha mente. Valeu!

À Barretinha, Sandra, André e Joáz pela amizade e conversas agradáveis!

À Gisele (Agroenergia) pela amizade, paciência, humildade e sábios conselhos.

À Bárbara e Polyana pela amizade, por suportarem um calor de quase 40°C na casa de vegetação (rs...) e auxílio/conhecimento técnico.

Ao Rodrigo (Agroenergia) por sempre estar disposto a ajudar.

Ao Dr. Hugo, por ser um exemplo a seguir como profissional e pessoa, por se destacar na sua maneira de conduzir uma equipe, por ser humano, mesmo quando se depara em um ambiente fundamentalmente objetivo, enfim, por despertar em mim o gosto e o encantamento pela ciência.

Ao Dr. Adilson, pela paciência e ensinamentos, por acender em mim um espírito investigativo e crítico que a pesquisa exige.

Ao Dr. Carlos pelo enorme conhecimento transmitido e boa vontade em ensinar.

Ao Dr. Frederico Durães, Dr. Antônio Carlos, Gislene, Beatriz e Bira (Embrapa Milho e Sorgo), pela disponibilidade, apoio técnico e acesso ao conhecimento da área afim.

Ao Wilson, Marquinho, André e colaboradores pela disponibilidade e dicas de elétrica e hidráulica.

Ao professor Pierre, pela simpatia, grande conhecimento e presteza em ajudar sempre que necessário. Você também me inspirou!

Ao professor Alan Carvalho e Dra. Fátima Grossi de Sá, pela disponibilização do espaço laboratorial ao longo de um ano de experimento.

Ao professor Antônio Chalfun, pela flexibilidade e por me proporcionar a oportunidade de realizar o trabalho na Embrapa Agroenergia. Por incentivar seus alunos a procurarem novas fronteiras em busca de conhecimento e experiências internacionais.

Ao professor Luciano, pela atenção, disposição/preocupação em contribuir para o crescimento do curso, professores e discentes.

Aos professores da PUC- Minas, em ênfase para Enemir, Ari, Miguel, Alzira, Lu, Virgínia, Fatinha, Fred e Horácio os quais foram a base do meu perfil profissional e conhecimento técnico- científico.

Ao corpo docente da UFLA que foi fundamental em meu conhecimento aprofundado na atual área de pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista vitoriosa que gerou a presente dissertação!

RESUMO GERAL

Períodos de déficit hídrico são frequentes nas regiões áridas e semi-áridas do Brasil, principalmente, na Região do Bioma Cerrados onde a cultura da cana-de-açúcar tem avançado a cada safra. Este estresse ambiental, quando persiste por longos períodos, pode causar perdas consideráveis de 50% ou mais na produtividade das culturas dependendo da sensibilidade da espécie e nível de estresse a que elas foram submetidas. Em resposta ao déficit hídrico, as plantas ativam mecanismos que auxiliam na redução da perda de água, reparo/proteção celular como consequência da eficiência do uso da água (EUA). O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a resposta molecular, fisiológica e fenotípica de plantas transgênicas de cana-de-açúcar, contendo a construção gênica *ZmRab17::AtDREB2A CA* sob condições de déficit hídrico em casa de vegetação. Oito eventos independentes foram obtidos via biobalística com eficiência de transformação de 3,3%. Análises de *Southern blot* dos eventos revelaram que o número de cópias do transgene variou de uma a mais de quinze. Plantas transgênicas do evento 24.2 apresentaram taxas fotossintéticas 12 vezes maiores do que as plantas não-transgênicas, no segundo dia após a suspensão da irrigação, mantendo taxas, significativamente, superiores até o terceiro dia. Ao final do experimento, as taxas fotossintéticas, para ambos os materiais, foi quase nula. O potencial hídrico foliar ao final do experimento das plantas transgênicas foi de -1,3 MPa, enquanto que as não-transgênicas de -2,0 MPa. O evento 24.2 apresentou um teor de sacarose 33,8% maior que as plantas não-transgênicas. Além disso, o comprimento linear total do colmo foi aproximadamente 20% superior. O peso seco de parte aérea e de raízes, assim como as análises fenotípicas de raiz por imagem não diferiram significativamente. Nestes resultados foram demonstrados que as plantas transgênicas de cana-de-açúcar do evento 24.2 tiveram aumento na tolerância ao déficit hídrico sem comprometimento na produtividade.

Palavras-chave: Tolerância à seca. Gene *AtDREB2A CA*. Cana-de-açúcar. Estresses abióticos. Rhizotron.

GENERAL ABSTRACT

Periods of drought are frequent in the arid and semi -arid regions of Brazil, especially in the Cerrado biome where the sugarcane culture has advanced each season. When this environmental stress persists for long periods, it may cause the considerable loss of 50 % or more in crop yields, depending on the species' sensitivity and the level of stress to which they were subjected. In response to drought, plants activate mechanisms that assist in the reduction of water loss and cell repair/protection as a result of efficient water use (USA). This study aimed at evaluating the molecular, physiological and phenotypic responses of transgenic sugarcane plants, containing the *ZmRab17 :: AtDREB2A CA* gene construction, under water deficit conditions in a greenhouse. Eight independent events were obtained by biolistic with a 3.3% transformation efficiency. Southern blot analysis of the events revealed that the number of transgene copies ranged from one to more than fifteen. Transgenic plants from the 24.2 event presented photosynthetic rates 12 times higher than the non-transgenic plants on the second day after the irrigation suspension, maintaining significantly superior rates until the third day. At the end of the experiment, photosynthetic rates for both materials were almost nil. The leaf water potential of the transgenic plants at the end of the experiment was of -1.3 MPa, while for the non – transgenic plants was of -2.0 MPa. The 24.2 event presented sucrose content 33.8 % higher than the non-transgenic plants. In addition, the total linear length of the stem was approximately 20 % superior. The dry weight of shoots and roots, as well as the imaging phenotypic analysis of the roots did not differ significantly. These results demonstrated that the transgenic sugarcane plants of the 24.2 event had increased tolerance to water deficit without compromising productivity.

Keywords: Drought tolerance. *AtDREB2A CA* gene. Sugarcane. Abiotic stresses. Rhizotron.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 11
2	OBJETIVOS 18
2.1	Objetivo geral 18
2.2	Objetivos específicos 18
3	REFERENCIAL TEÓRICO 20
3.1	Importância econômica e setores envolvidos da cultura canavieira 20
3.2	Demanda mundial de cana-de-açúcar 22
3.3	Origem e disseminação mundial de <i>Saccharum spp</i> 23
3.4	Melhoramento genético de cana-de-açúcar 25
3.4.1	Complexo poliploide e silenciamento gênico 26
3.4.2	Variedade RB855156 - Características agromorfológicas 27
3.5	Estresses abióticos que comprometem a cultura da cana-de-açúcar 28
3.6	Déficit hídrico 28
3.7	Plantas geneticamente modificadas (PGMs): Cenário e perspectivas 32
3.7.1	Cana-de-açúcar geneticamente modificada 40
3.8	Mecanismos moleculares de tolerância ao déficit hídrico 48
3.8.1	Fatores de transcrição 52
3.9	DREB2A 53
3.9.1	Plantas transformadas com fatores de transcrição 54
3.10	Gene induzido por estresse abiótico (<i>ZmRab17</i>) 57
	REFERÊNCIAS 58
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO 82
	ARTIGO 1 Induced over-expression of <i>atdreb2a ca</i> improves drought tolerance in sugarcane 82

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Em um contexto mundial, a população passa por uma problemática bastante preocupante: mudanças climáticas (aquecimento global). Essa é ocasionada pela intensificação do efeito estufa. Esse atua no aquecimento da Terra, permitindo a existência de vida no planeta e é causado a partir da radiação solar recebida pela Terra, a qual parte é absorvida pela superfície terrestre (SILVA; PAULA, 2009).

A taxa de alteração da concentração de CO₂ atmosférico, há 10.000 anos, foi duas vezes menor que o aumento antropogênico de CO₂ desde a Revolução Industrial, iniciada em 1760 na Inglaterra, até os dias atuais. O uso crescente de combustíveis fósseis e as mudanças em larga escala do uso das terras resultaram no aumento das concentrações de gases de efeito estufa na atmosfera, afetando o clima global. Entre 1861 e 2000 a temperatura média mundial aumentou 0,6°C (MACHADO, 2005).

Apesar destes fenômenos ocorrerem naturalmente, com o aumento da poluição, por meio de ações antrópicas, o efeito é intensificado, consequentemente, reforça todo o processo, desencadeando inúmeras implicações como: tempestades, inundações, seca (aumento da demanda por irrigação); salinização dos solos; perda da produtividade na agricultura; escassez de alimentos; aumento no custo dos alimentos; demanda por novos recursos agrícolas e energéticos renováveis.

Além do aumento da temperatura, a água é um dos fatores ambientais que provoca maior limitação na produtividade (MARCINSKA et al., 2013). Crusiol, Carvalho e Farias (2012) descreveram que as oscilações na produtivida-

de e na qualidade dos grãos da soja, por exemplo, estão relacionados com os períodos em que ocorreram déficit ou excesso de água.

De acordo com dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2013), desde 2004, os preços para a maioria dos grãos começaram a subir. Embora tenha havido um aumento da produção, a demanda foi maior. Outros fatos que reforçam a ideia da redução na distribuição de alimentos foram vivenciados nos anos de 2005, em que a produção de alimentos foi afetada por incidentes meteorológicos extremos nos principais países produtores de alimentos. Em 2006, ano em que a produção mundial de cereais caiu 2,1% e 2007, em que a elevação do preço do petróleo aumentou, também, os custos de fertilizantes e da produção alimentos. Portanto, aquecimento global e escassez hídrica demandam cada vez mais pesquisas direcionadas à resolução ou mesmo adaptação a este novo cenário. Logo, reduzir a emissão dos gases de efeito estufa, responsáveis pelo aquecimento global, reflete na substituição dos combustíveis fósseis por fontes renováveis de energia.

Neste cenário, a cultura de cana-de-açúcar seria interessante na geração de energia renovável. Globalmente, a cana-de-açúcar ocupa uma posição de destaque como cultura agroindustrial sendo cultivada amplamente nas regiões tropicais. Mais de 80% do açúcar mundial são produzidos, a partir de cana-de-açúcar, principalmente, nos países em desenvolvimento e emergentes citados na Tabela 1. A produção garante renda a milhões de agricultores em muitas áreas rurais. De acordo com a União da Indústria de Cana-de-Açúcar - UNICA (2012), o setor sucroalcooleiro energético brasileiro criou 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos na área rural. Mais de 70 mil produtores trabalharam na safra 2009/2010. A cana-de-açúcar é cultivada em mais de 20 milhões de hectares em 121 países (Figura 1). Na safra 2009/10, a produção mundial foi de 1524,4 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (Tabela 1).

Tabela 1 Maiores produtores de cana-de-açúcar e dados de produção (2009/2010)

País	Posição	Açúcar (milhões ton)	Colmos (milhões ton)	Área colhida (milhões ha)	Produtividade (ton/ha)
Brasil	1	32,9	569,4	7,40	76,9
Índia	2	16,1	272,0	4,41	61,7
China	3	12,5	113,7	1,20	67,5
Tailândia	4	7,5	66,4	1,00	66,5
México	5	5,2	42,2	0,66	64,1
Austrália	6	4,8	31,7	0,38	83,5
Paquistão	7	3,5	51,5	1,00	52,0
EUA	8	3,0	27,8	0,36	77,2
Indonésia	9	2,9	25,3	0,33	76,7
Colômbia	10	2,5	38,5	0,45	85,5
Argentina	11	2,4	21,3	0,31	69,4
África do sul	12	2,3	19,3	0,31	62,1
Guatemala	13	2,2	20,1	0,22	91,6
Total	---	97,8	1316,6	18,03	---
Mundo	---	117,5	1524,4	19,50	---

Fonte: Licht (2010)

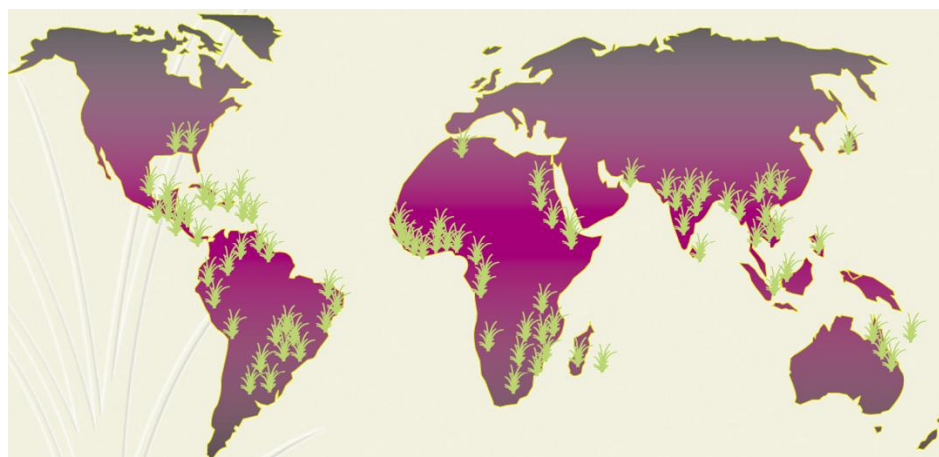


Figura 1 Áreas sob cultivo com cana-de-açúcar no mundo. No total, 121 países produzem cana-de-açúcar para diversas finalidades, sendo a principal a produção de açúcar

Fonte: UNICA (2012)

O Brasil é o país com a matriz energética mais renovável do mundo. Em 2012, as fontes energéticas renováveis somaram 44,1% da oferta interna de energia brasileira (BRASIL, 2007; EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2012).

O país se destaca na produção de etanol (fonte de energia natural, renovável e sustentável), a partir da cana-de-açúcar, pouco mais da metade da gasolina consumida é substituída pelo etanol. É válido lembrar, também, que o uso do bagaço da cana-de-açúcar, para gerar eletricidade, pode alcançar, até 2020, um coeficiente de produção comparável à produção da usina de Itaipu (SOUZA, E. et al., 2010).

A cultura canavieira é de grande importância econômica no agronegócio brasileiro e está entre as três culturas mais importantes do país, ficando atrás apenas do milho e da soja. A sacarose da cana-de-açúcar destina-se, fundamentalmente, à produção de açúcar e etanol. O bagaço, oriundo do processamento industrial, é utilizado na geração de vapor, para movimentar a usina e a energia

elétrica excedente é distribuída ao sistema elétrico nacional. Além disso, o bagaço de cana-de-açúcar pode ser aproveitado, ainda, para produção de ração animal.

Apesar das perspectivas na cultura, a cana-de-açúcar, como outras *commodities*, também, sofre com os efeitos ambientais. Na safra 2011/2012 houve uma redução de 16% na produtividade, quando comparada com a média histórica, podendo estar associada com períodos de seca, no meio do ano, florescimento acentuado e geadas. Além disso, o teor de sacarose, também, foi afetado (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA - CTC, 2012). Já na safra 2012/13, a influência dos fatores ambientais confirmou-se na Região Nordeste que sofreu a maior seca dos últimos 40 anos e foi afetada na atividade sucroalcooleira, provocando descapitalização das usinas o que desestimulou o aumento da área plantada (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013). Entretanto, ainda segundo dados deste mesmo levantamento, as demais regiões produtoras, como a Região Centro-Sul apresentou acréscimo na produção de cana-de-açúcar que foi estimada em 594,07 milhões de toneladas, 11,5% maior que a produção da safra anterior.

As tecnologias genômicas podem oferecer ferramentas biotecnológicas úteis, para um melhor entendimento sobre o estresse, bem como soluções para mitigar as mudanças ambientais. Plantas geneticamente modificadas representam uma oportunidade de minimizar os danos causados pela escassez de água (entre outros fatores abióticos/bióticos) com o intuito de maximizar a produção em áreas marginais ou tradicionais afetadas cada vez mais pelo clima.

A engenharia genética, como um ramo da tecnologia genômica, é útil como auxílio ao melhoramento genético tradicional, facilitando a obtenção de caracteres agrônômicos de interesse não encontrados naturalmente, ou ainda, de difícil introgressão na cultura, pelos métodos de melhoramento convencional. Deste modo, desenvolver ferramentas biotecnológicas (identifica-

ção/caracterização de promotores, genes, entre outros) e variedades de cana-de-açúcar tolerantes a diversos tipos de estresses ambientais é de grande importância no aspecto produtivo (maximizar o uso do solo e seus atributos nas áreas já plantadas) e expansão das áreas agricultáveis.

Plantas geneticamente modificadas já foram geradas e analisadas para diversos genes de interesse em várias espécies no Brasil. Tais estudos conferiram às plantas-alvo características de resistência e tolerância, aplicadas ao mercado agrícola, que obtiveram parecer positivo para comercialização pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), têm-se alguns exemplos como: soja (Intacta RR2 PRO - Monsanto 2010) tolerante à herbicida e resistente a insetos; algodão (Bolgard I Roundup Ready - Monsanto 2009) tolerante à herbicida e resistente a insetos; algodão (GlyTol - Bayer 2010) tolerante à herbicida; milho (TL TG Viptera - Syngenta 2010) resistente à insetos e tolerante a herbicida. Recentemente, foi lançado pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) o feijão transgênico (Embrapa 5.1), o qual teve como base a tecnologia do RNAi (RNA interferente) que conferiu à planta resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (COMISSÃO TÉCNICA DE BIOSSEGURANÇA - CTNBIO, 2013).

Plantas modelo como tabaco, *Arabidopsis* e arroz foram, geneticamente, modificadas e, posteriormente, avaliadas visando à elucidação dos mecanismos fisiológicos e moleculares relacionados à tolerância a diferentes estresses abióticos mediante fatores de transcrição.

Os fatores de transcrição (FTs) são proteínas reguladoras que se ligam a sequências nucleotídicas específicas localizadas a montante das regiões promotoras de genes e, por meio dessa ligação, podem ativar ou reprimir a transcrição dos genes. Os FTs atuam ativando uma cascata de genes funcionais, os quais serão responsáveis por desencadear nas plantas reações químico-fisiológicas que podem minimizar os efeitos do estresse a que o vegetal está sendo submetido. Os

FTs, por sua vez, são ativos, quando a planta está exposta a algum fator ambiental ou biológico adverso, por exemplo, déficit hídrico, excesso de sais, alta/baixa temperatura, ataque por insetos-praga e doenças (DAVIDSON, 2006).

Desta forma, a obtenção de variedades de cana-de-açúcar com a expressão estresse-induzida do fator de transcrição *AtDREB2A CA* representa uma estratégia promissora, para aumentar a tolerância aos estresses ambientais, além de fornecer um importante material tanto para estudos sobre mecanismos de tolerância a estresses abióticos como para utilização direta no sistema agrícola nacional.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar plantas de cana-de-açúcar contendo a construção gênica *ZmRab17::AtDREB2A CA* em condições de déficit hídrico.

2.2 Objetivos específicos

- a) Obter eventos de cana-de-açúcar variedade RB855156 com a construção gênica *ZmRab17::AtDREB2A CA* via bombardeamento de calos embriogênicos.
- b) Avaliar o número de inserções do transgene *AtDREB2A CA* por *Southern blot* em diferentes eventos, previamente selecionados, considerando testes de resistência ao herbicida Finale[®] (glufosinato de amônio) e PCR convencional.
- c) Quantificar, por RT-qPCR, a expressão dos genes *AtDREB2A CA*; *galactinol synthase (GOLS)*, *SCDR2* e *SCDR4* de cana-de-açúcar em resposta ao déficit hídrico.
- d) Avaliar os parâmetros fisiológicos como a taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E), concentração interna de CO_2 (C_i), potencial hídrico foliar (Ψ_L) e conteúdo relativo de água (CRA), além dos fitotécnicos (comprimento linear total do colmo, comprimento dos entrenós, pesos seco e fresco da parte aérea e raiz, comprimento e diâmetro de raiz) do evento 24.2 em sistema de rhizotron.

- e) Determinar o conteúdo de sacarose nas plantas de cana-de-açúcar transgênicas (evento 24.2) e não transgênicas sob condições de déficit hídrico em sistema de rhizotron.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Importância econômica e setores envolvidos da cultura canavieira

A cana-de-açúcar possui grande relevância na economia brasileira. Esta cultura se destaca como sendo representante de uma nova tendência mundial, a sustentabilidade. Nessa vertente de qualidade ambiental, a cana-de-açúcar gera energia renovável, o que agrega valor ao produto. Segundo Borba e Bazzo (2009), além do setor energético, a cana-de-açúcar é utilizada, tradicionalmente, para produção de açúcar e seu bagaço na geração de vapor para movimentar a usina e o excedente gerar energia elétrica ao sistema elétrico nacional ou, ainda, pode ser utilizado na fabricação de ração animal. A espécie pode ser aplicada ainda de variadas maneiras: como matéria-prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente, participa na produção de plástico verde e de farneseno (Amyris) a partir do melaço.

O PIB (Produto Interno Bruto) do setor sucroenergético foi estimado em R\$ 57,33 bilhões, em 2010, equivalente a 1,6% do PIB nacional, 7,0% do PIB agropecuário e 9,9% do PIB da agricultura. A análise do PIB setorial indica que, no mesmo ano, o etanol vendido no mercado interno representou 49,3% do total produzido; o açúcar no mercado externo representou 35,0% enquanto no mercado interno foi de 11,8% (CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA - CNI, 2012).

Dentre os principais países produtores, encontram-se a Índia, China, Tailândia e Austrália, sendo o Brasil o primeiro no ranking mundial. Estima-se que, para a safra 2013/14, a cultura da cana-de-açúcar continuará em expansão. A previsão é de que o Brasil tenha um acréscimo na área de cerca de 410 mil hectares, equivalendo a 4,8% em relação à safra 2012/13. São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul deverão ser os Estados com maior acréscimo de

áreas com 141,4 mil hectares, 106,1 mil hectares, 101,1 mil hectares e 43,5 mil hectares, respectivamente (CONAB, 2013).

A expansão do setor sucroenergético trouxe um avanço na economia brasileira. Desde 2005, entraram em operação 117 novas unidades produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade. O impacto da construção dessas novas unidades impulsionou outros setores da economia, como construção civil, siderurgia, fabricação de máquinas e tratores e outros bens de capital, fertilizantes, produtos de proteção ao cultivo e outros (CNI, 2012). Embora em uma estimativa da produção agrícola de novembro de 2012 em relação a 2011, a cultura apresentou uma variação negativa de -7,6% (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013).

Segundo a Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE VEÍCULOS AUTOMOTORES - ANFAVEA, 2013), 87% dos veículos leves vendidos no Brasil, atualmente, têm motor *flex fuel*. Isso amplia a possibilidade da escolha do combustível a ser utilizado pelo consumidor e garante ao mesmo a oportunidade de ser ativo ecologicamente, ao passo de fazer uso de um combustível que muitas vezes torna-se mais barato do que a tradicional gasolina.

A participação de automóveis *flex*, segundo dados da ANFAVEA (2013), aumentou cerca de 80% de 2005 para 2012. Atualmente, a frota de veículos com este tipo de fonte energética em circulação já ultrapassa 12 milhões de unidades. Entretanto, o aumento na produção de etanol foi pouco significativo no mesmo ano, enquanto em 2011/2012 foram produzidos 22.857.589,2 milhões de litros, em 2012/2013 foi de 23.956.381,5 milhões de litros (CONAB, 2012).

No ano de 2030, de acordo com as estimativas, a cana-de-açúcar e seus derivados passarão a ser a segunda fonte de energia mais importante da Matriz Energética Brasileira, com 18,5% de participação (BRASIL, 2007).

A demanda mundial por etanol como combustível e energia renovável, torna-se mais necessária e de grande interesse internacional. Desde 1987, países membros da União Europeia já fazem uso do etanol, neste mesmo ano o governo francês promulgou uma lei que permitiu a mistura de 3 a 15% de oxigenados orgânicos ao petróleo (gasolina) e em 1992 concedeu incentivos ao uso do etanol por meio de uma taxa doméstica. A Espanha, também, passou a utilizar etanol na mistura do combustível em 1995 (LANNEREE; MONIER, 2000).

Com a implantação dos programas de bioetanol em diversos países, acredita-se em um aumento no comércio exterior de etanol combustível, isso, em um panorama do mercado brasileiro. O Japão, por exemplo, não terá condições de produzir etanol a partir de arroz suficiente para suprir a sua demanda energética. Assim, o Brasil poderá ser o principal fornecedor deste combustível nos próximos anos. O Conselho Europeu sugeriu a utilização de combustíveis derivados de fontes agrícolas (biocombustíveis), sendo esta a tecnologia com maior potencial no curto e médio prazo. O setor sucroalcooleiro do Brasil, pelo mercado de etanol hidratado mostrou-se com maior potencial de crescimento (FIGUEIRA; BURNQUIST, 2008).

3.2 Demanda mundial de cana-de-açúcar

De acordo com o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - IPEA (2013) um estudo realizado pelo Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) e pela Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI), em abril de 2006, indica que o consumo mundial de etanol combustível passará de 26 bilhões de litros atuais para 205 bilhões em 2025. Dentre a demanda mundial, quarenta países já misturam o etanol à gasolina com o intuito de reduzir a emissão de gases que provocam efeito estufa e a dependência de petróleo importado.

Combustíveis que utilizam o etanol proveniente tanto de cereais, celulose quanto da cana-de-açúcar são cerca de 50% menos poluentes que a gasolina. A mistura de 10% de etanol à gasolina já adotada como política em diversos países diminui em até 19% a emissão dos gases relacionados ao efeito estufa. É válido ressaltar que o etanol gera energia consideravelmente maior do que a necessária no seu ciclo produtivo: no caso da cana-de-açúcar, cada unidade de energia fóssil utilizada no processo gera 8,3 unidades de energia renovável. Já o combustível derivado do milho gera apenas 1,4 unidades de energia renovável para cada unidade de energia fóssil, isso significa a menor eficiência no balanço energético (IPEA, 2013).

Deste modo, a produção de cana-de-açúcar torna-se uma fonte de energia potencial do mercado interno nacional, uma vez que a demanda desta *commodity* cresce. Isso implica garantir reduções na perda da produtividade, a partir de investimentos em tecnologia de campo e avanços na área genômica visando a uma planta resistente ou tolerante a estresse ambientais.

3.3 Origem e disseminação mundial de *Saccharum* spp

A cana-de-açúcar pertence à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, subclasse Commelinidae, ordem Cyperales, família Poaceae, sub-família Panicoideae, tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum*. É uma monocotiledônea alógama e semi-perene (CESNIK; MIOCQUE, 2004; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; JANNOO et al., 1999).

De acordo com Daniels, Smith e Paton (1975), a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é considerada uma planta nativa do arquipélago Malaio, Nova Guiné, ou de alguma ilha da Malanésia ou Polinésia. Brandes (1926), após expedição em Papua Nova Guiné, para coleta de germoplasma, verificaram que a região apresentava grande diversidade populacional de *Saccharum*. Além disso,

registraram a ocorrência endêmica da espécie *S. robustum*, considerada ancestral selvagem de *S. officinarum*. Esta espécie foi disseminada em várias ilhas do Pacífico por meio das migrações náuticas. Em seguida, atingiu o sudeste asiático na região conhecida como Indochina (região conhecida como Vietnã, Laos e Camboja), migrando depois para Malásia, Bengala, China e finalmente Índia (MIRANDA, 2008).

Estudo sobre a diversidade genética, realizado por Jannoo et al. (1999), em 162 clones de cana-de-açúcar por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), mostrou que Nova Guiné seria o provável centro de origem da espécie. Ainda, de acordo com Miranda (2008), após a invasão dos persas à Índia no século VI a.C., a cana-de-açúcar foi levada para a Mesopotâmia onde foi aprimorada a técnica de produção do açúcar na forma cristalizada. Posteriormente, em 637 d.C., os árabes descobriram a produção açucareira dos persas. Assim, o oriente foi o maior fornecedor de açúcar para o ocidente. Em virtude da posição geográfica privilegiada de Portugal, a passagem de navios carregados de mercadorias era obrigatória e, dessa forma, a introdução do cultivo da cana-de-açúcar na Ilha da Madeira foi estimulada. O clima favoreceu a produção tanto de açúcar quanto de mudas que foram levadas para as Américas Central e do Sul, principalmente, para o Brasil.

Contudo, estes relatos ainda são controversos e outros estudos ainda devem ser realizados para confirmação do real centro de origem da espécie e seus gêneros correlacionados (CESNIK; MIOCQUE, 2004).

As primeiras mudas de cana-de-açúcar que chegaram ao Brasil foram plantadas na capitania de São Vicente, região onde hoje se localiza o estado de São Paulo. Ao longo das décadas, esta cultura foi introduzida em outros estados localizados ao nordeste do país, principalmente nas regiões costeiras entre a Bahia e Pernambuco (MIRANDA, 2008).

A cana-de-açúcar atualmente cultivada é originária de um cruzamento entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* o que aumentou a produtividade e a resistência a doenças dos clones atualmente cultivados. O sucesso do cultivo da cana-de-açúcar se deve à utilização de variedades, obtidas por meio de melhoramento genético tradicional, desenvolvidas pelos centros de pesquisa e estações experimentais (CESNICK; MIOCQUE, 2004; SACIOTO, 2003).

3.4 Melhoramento genético de cana-de-açúcar

Segundo Matsuoka, Ferro e Arruda (2009), o melhoramento genético direcionado para tolerância à seca em cana-de-açúcar tem avançado no desenvolvimento de variedades com bom desempenho em campo. Entretanto, o melhoramento clássico demanda tempo, além da cultura apresentar um estoque genético limitado relacionado à tolerância à seca nos bancos de germoplasma atuais da cultura. Consequentemente, a junção de ferramentas biotecnológicas e de engenharia genética na cultura de cana-de-açúcar será fundamental para a expansão do setor em áreas não tradicionais (SUPRASANNA et al., 2011).

O genoma da cana-de-açúcar, por questões de complexidade, impõe grandes desafios para o desenvolvimento de cultivares cada vez mais produtivos. Além disso, limita a utilização das sementes, via propagação sexual, por ser um híbrido poliploide. Isto limita ganhos genéticos em programas de melhoramento convencional, mesmo direcionando cruzamentos com parentais selecionados e avaliando centenas de milhares ou mesmo milhões de progênies em ensaios de campo em grande escala (ABROUK et al., 2010; MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009).

Além disso, a família Poaceae necessita de estudos aprofundados quanto aos mecanismos de incompatibilidade. A vasta complexidade embutida nesta, dentro dos cruzamentos entre espécies parentes, é, provavelmente, pela variabi-

lidade das interações alélicas. Sua principal função é promover o cruzamento entre indivíduos não parentais (CESNIK; MIOCQUE, 2004).

A incompatibilidade no gênero *Saccharum* é bem conhecida dos geneticistas, entretanto foi pouco investigada. A auto-incompatibilidade foi mais determinada em *S. rubustum*. Já a macho-esterilidade ocorre mais frequente em plantas descendentes de *S. sinense* e *S. barberi* do que em *S. officinarum*. Em programas de melhoramento, a macho-esterilidade possui uma importância muito grande (CESNIK; MIOCQUE, 2004).

3.4.1 Complexo poliploide e silenciamento gênico

O melhoramento clássico bem como a transgenia em cana-de-açúcar por ser uma cultura monocotiledônea e poliploide tornam-se processos bastante complexos e difíceis. O silenciamento gênico é percebido com evidência em cana-de-açúcar, após a inserção de construções gênicas diversas em seu complexo genoma poliploide (ROBERT et al., 2010). As cultivares no mundo são resultado do cruzamento entre *S. officinarum*, contendo número de cromossomos igual a 10 e constituição cromossômica de $2n=80$ e *S. spontaneum* contendo 8 cromossomos e constituição cromossômica de $2n=40-128$. Os híbridos inespecíficos entre estas duas espécies resultaram em uma complexa constituição cromossômica, variando de $2n=100-130$. Os híbridos preservam intactos 15-25% dos cromossomos herdados de *S. spontaneum* e 60-70% herdados de *S. officinarum*. Aproximadamente de 5-10% são provenientes de cromossomos recombinantes entre estas duas espécies (HONT et al., 1996, 1998; MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009).

Conforme Baulcombe e English (1996), o silenciamento gênico em plantas envolve mecanismos de defesa do próprio vegetal. Estes processos evoluíram para a defesa da planta contra vírus e transposons. Além disso, é possível

que o silenciamento gênico seja um mecanismo de controle associado à exploração da poliploidia em processos evolutivos e de desenvolvimento da planta (LEITCH; BENNETT, 1997; TRAAS et al., 1998).

Uma ocorrência comum com consequências negativas para a transgenia de plantas é o silenciamento coordenado de várias cópias do gene-alvo em uma célula. Pode haver, ainda, silenciamento do transgene em regiões hipermetiladas (MATZKE; MATZKE, 1998a, 1998b).

3.4.2 Variedade RB855156 - Características agromorfológicas

A variedade RB855156 foi obtida de um cruzamento entre RB72454 x TUC71-7 em 1985. Destacou-se pela precocidade de maturação, na fase experimental (MATSUOKA et al., 1995).

Esta variedade apresenta elevado perfilhamento, principalmente na soca, colmos eretos, mas decumbentes na fase adulta, empalhados, de diâmetro fino a médio e de cor verde-clara. Exibe palmito de tamanho regular, folhas de largura média longas, arqueadas no terço superior, verdes opacas, com bastante joçal na bainha e decíduas. Os colmos têm crescimento ereto, diâmetro médio a fino, com internódios dispostos em leve *zig-zag*. A gema é de formato romboide (MATSUOKA et al., 1995). Pode apresentar falha de brotação inicial em algumas situações ainda não identificadas. Contudo, é bastante resistente às principais doenças: carvão, escaldadura-das-folhas, estria vermelha, ferrugem e mosaico (MATSUOKA et al., 1995).

As variedades RB (República do Brasil) ocupam 62% do total dos canaviais do Brasil (REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO - RIDESA, 2012). Um facilitador no sistema produtivo da cana-de-açúcar no país é o sistema de colheita mecanizada que representou 37% da safra 2008, hoje esse índice ultrapassa 90% na

região Centro-sul do Brasil, isso indica um grande avanço no fechamento do ciclo agrícola (CTC, 2011).

3.5 Estresses abióticos que comprometem a cultura da cana-de-açúcar

No Brasil, dentre estes fatores ambientais adversos (déficit hídrico, salinidade, baixas e altas temperaturas, inundação, poluentes e radiação) o déficit hídrico é o que mais afeta de maneira negativa o crescimento, metabolismo e produtividade da cana-de-açúcar. Assim, seus efeitos nas plantas incluem redução nas taxas de assimilação de CO₂, tamanho das células foliares, taxa de transpiração, potencial de água na planta, taxa de crescimento e abertura estomática (LAWLOR, 2013). Nos últimos anos no país segue uma tendência à expansão de áreas agricultáveis, contudo, as regiões que mais sofrem com estas ocorrências de longos períodos sem água, regiões áridas e semi-áridas, não conseguem avançar no aumento de área para cultivo, além de prejuízos econômicos em consequência da perda da produtividade (CONAB, 2013).

3.6 Déficit hídrico

O déficit hídrico é um agravante quando se trata da queda na produtividade das culturas, acarretando em grandes perdas no mundo todo. Os danos celulares (metabólicos, bioquímicos e fisiológicos) provocados pelo estresse, comprometem o desenvolvimento da planta e isso dependerá da intensidade, duração e, principalmente, da fase do ciclo de vida em que ocorre. Tais danos podem tornar-se irreparáveis e irreversíveis podendo levar à morte vegetal. Os prejuízos causados pela seca nas plantas demandam dos produtores investimentos em técnicas de manejo como a irrigação, e isso, dependendo da qualidade da água e da região de instalação do sistema, ocasiona outros problemas, como a alta concen-

tração de sais no solo. Conseqüentemente, o produtor passa agora a ter dois problemas: estresse por déficit hídrico e estresse salino.

Após a percepção e transmissão de sinais, em decorrência da seca nas plantas, há um aumento na concentração de ácido abscísico (ABA) no xilema, o qual controla inúmeras respostas adaptativas ao estresse, ativando genes ligados ao ajustamento osmótico, compartimentação iônica, crescimento e modulação das raízes e sua condutividade hidráulica, limita a taxa de transpiração, controla a desidratação, induz o fechamento estomático e diminuição do crescimento foliar. Essa é uma resposta precoce e a mais sensível ao déficit hídrico (BLUM, 1997; HANSON; HITZ, 1982; HSIAO, 1973; POSPÍŠILOVÁ et al., 2009; RUGGIERO et al., 2004; SALISBURY; ROSS, 2013; VERSLUES; ZHU, 2005). O ABA controla a expressão de vários genes sob condições de dessecação e estresse osmótico (INGRAM; BARTLES, 1996). Já a resposta na raiz é distinta, ao contrário do que ocorre na parte aérea, há expansão do sistema radicular, pois o ABA inibe a síntese de etileno local (BLUM, 1997; HANSON; HITZ, 1982; HSIAO, 1973). Na porção aérea da planta, ocorre um aumento das taxas de citocininas e auxinas, protegendo o aparato fotossintético e cloroplastos, amenizando o efeito do déficit hídrico permitindo recuperação mais rápida da planta frente ao estresse (KRAMER; BOYER, 1995; YORDANOV; VELIKOVA; TSONEV, 2000).

O fechamento estomático é o primeiro processo a ser ativado em resposta à seca, isso evitando a cavitação e falha no sistema de condução hídrica (CHAVES, 1991). Esta etapa resulta na menor absorção de dióxido de carbono (CO₂) e, conseqüentemente, queda na taxa fotossintética, mas nem sempre essa queda é resultado da redução do fechamento estomático (MANSFIELD; DAVIES, 1981). As mudanças na atividade fotossintética podem estar associadas aos danos de membrana nas células do mesófilo, a diminuição no teor de clorofila ou, ainda, alteração na síntese e transporte de assimilados (CORNIC; MASSA-

CCI, 1996). Este decréscimo na taxa de fotossíntese líquida sob estresse, também, está relacionado com danos bioquímicos de natureza não-estomática, causada pela oxidação dos lipídios encontrados no cloroplasto e às mudanças na estrutura dos pigmentos e proteínas. O estresse por déficit hídrico provoca um aumento no conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ROS) causando danos à membrana celular (DHANDA; SETHI; BEHL, 2004; LI; JIAO; WANG, 2004; MILLER et al., 2010; RAUF et al., 2007; SHAO et al., 2005; YORDANOV; VELIKOVA; TSONEV, 2000).

De acordo com estudos de Miller et al. (2010), Neill et al. (2002) e Tuteja et al. (2011), as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR), peroxidases (POX) e outras redutases são ativadas em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo déficit hídrico. O efeito negativo das ROS, também, pode ser atenuado pela presença de compostos antioxidantes (e.g. ascorbato, glutatona, tocoferol e carotenoides) (DESIKAN et al., 2004).

A produção de ROS no fotossistema II (PS2) causa danos nas membranas dos tilacoides, e são produzidas quando os elétrons da molécula de água são transferidos ao oxigênio. Os cloroplastos são as organelas mais suscetíveis ao estresse oxidativo, principalmente em razão da elevada concentração de oxigênio no interior dos mesmos (CORNIC; BRIANTAIS, 1991; CORNIC; MASSACCI, 1996).

Em plantas estressadas, o ajuste osmótico pode ocorrer, a partir do acúmulo de solutos orgânicos de baixo peso molecular, aminoácidos livres e íons inorgânicos. Os osmólitos mais comumente encontrados são os carboidratos solúveis (sacarose, frutose e glicose) e prolina, apesar dos íons inorgânicos também contribuírem para o ajustamento osmótico (Na^+ , NO_3^- , SO_4^- , K^+ , Cl^- , Ca^+) (CHEN; JIANG, 2010). O acúmulo de prolina é uma característica marcante em muitas espécies sob deficiência hídrica (BANDURSKA, 2000; BANDURSKA; GO'RNÝ; ZIELEZIN'SKA, 2008; DACOSTA; HUANG, 2006; JAVADI; AR-

ZANI; EBRAHIMZADEH, 2008). Este aminoácido regula o acúmulo de nitrogênio utilizável, é osmoticamente ativo e contribui para a estabilidade de membranas (OZTURK; DEMIR, 2002). Além disso, a prolina pode agir como uma molécula sinalizadora e reguladora capaz de ativar múltiplas respostas, que são elementos do processo de adaptação e tolerância. Outra função importante é a capacidade antioxidante, estabilizando ROS e ainda a ativação de enzimas de desintoxicação de vias alternativas (MATYSIK et al., 2002; RUGGIERO et al., 2004; SZABADOS; SAVOURE, 2010).

Além dos osmoprotetores citados acima, existem moléculas cuja função é igualmente importante na proteção da estrutura celular ao longo do período de estresse, são o grupo das chaperonas que inclui as proteínas: LEA (*Late Embryogenesis Abundant Proteins*) e DHN (dehidrinas). Em relação às primeiras, têm-se como exemplo as proteínas de choque térmico HSP (*Heat-Shock Proteins*), as quais atuam na ativação do sistema de reparo das membranas, além de participarem da síntese, degradação, transporte, maturação e proteção de proteínas em vários tecidos e em estádios de maturidade também distintos, pode ainda recuperar a forma original de proteínas inativadas pela dessecação (BOHNERT et al., 2001; SEKI et al., 2001; ZHU, 2001).

As proteínas LEA desempenham um papel de proteção, ativam o sistema de reparo de danos das membranas celulares. Estas proteínas são hidrofílicas e ligam-se fortemente à água. Sua função pode estar associada à capacidade de reter água e deste modo evitar a cristalização de proteínas e outras moléculas importantes durante períodos de seca (BOHNERT et al., 2001; SEKI et al., 2001; ZHU, 2001).

Já as dehidrinas, estabilizam macromoléculas permitindo o crescimento celular em raízes sob déficit hídrico e assim como outras chaperonas atuam na proteção de proteínas contra agentes desnaturantes, mediante a captura de íons e

reestabelecimento das pontes de hidrogênio, o que auxilia na estabilidade de membrana (CHAVES; OLIVEIRA, 2004).

A eficiência no uso da água (EUA), também, é uma estratégia para melhorar o desempenho das culturas, não só por uma diminuição da condutância estomática, mas também pelo aumento da capacidade fotossintética (MARCINSKA et al., 2013).

3.7 Plantas geneticamente modificadas (PGMs): Cenário e perspectivas

As culturas geneticamente modificadas, nos países em desenvolvimento, cresceram cerca de 50% em 2011. O Brasil ocupa o segundo lugar, fica atrás apenas dos Estados Unidos (EUA) em área plantada de transgênicos do mundo, com 30,3 milhões de hectares, e está emergindo como um líder global em culturas biotecnológicas. O país sofreu um aumento de 4,9 milhões de hectare, equivalente a um aumento ano a ano de 20 % (INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS - ISAAA, 2013).

No Brasil, os estados que mais utilizam a tecnologia da transgenia em suas culturas de interesse são: Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Paraná e Goiás. Trinta e seis variedades transgênicas de milho, soja, algodão, feijão foram aprovadas no Brasil, incluindo tolerantes a herbicidas e resistência a pragas e doença (Tabela 2). Nos EUA, o plantio comercial de híbridos de milho geneticamente modificados (GM) para tolerância à seca está previsto para 2013, podendo chegar ao Brasil em 2015 (MONSANTO, 2013).

Tabela 2 Resumo Geral de Plantas Geneticamente Modificadas aprovadas para Comercialização

Produto	Nome Comercial	Eventos	Organismo Doador	Característica	Requerente	Ano de Aprovação	
Soja	Roundup Ready	GTS-40-3-2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante à Herbicida	Monsanto	1998	
	Cultivance	BPS-CV-127-9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tolerante à Herbicida	BASF & Embrapa	2009	
	Liberty Link TM	A5547-127	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante à Herbicida	Bayer	2010	
	Liberty Link TM	A2704-12	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante à Herbicida	Bayer	2010	
	Intacta RR2 PRO		MON87701 &	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante à Herbicida e	Monsanto	2010
			MON89788	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistência a insetos		
Milho	Yield Gard	MON810	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a insetos	Monsanto	2007	
	Liberty Link	T25	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante à Herbicida	Bayer	2007	
	TL	Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a insetos e Tolerante à herbicidas	Syngenta	2007	

“Tabela 2, continuação”

Produto	Nome Comercial	Eventos	Organismo Doador	Característica	Requerente	Ano de Aprovação
Milho	Roundup Ready 2	NK603	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante à Herbicida	Monsanto	2008
	TG	GA21	<i>Zea mays</i>	Tolerante à Herbicida	Syngenta	2008
	Herculex	TC1507	<i>Bacillus gien-sis/Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a insetos e Tolerante à herbicida	Dow Agros-ciences	2008
	YR YieldGard/RR2	NK603 & MON810	<i>Agrobacterium tumefaci-ens/Bacillus thuringiensis</i>	Tolerante à Herbicida e Resistência a insetos	Monsanto	2009
	TL/TG	Bt11 & GA21	<i>Bacillus thuringiensis/Streptomyc-es viridochromo-genes/Zea Mays</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Syngenta	2009
	Viptera-MIR162	MIR162	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a Insetos	Syngenta	2009

“Tabela 2, continuação”

Produto	Nome Comercial	Eventos	Organismo Doador	Característica	Requerente	Ano de Aprovação
Milho	HR Herculex/RR2	TC1507 & NK603	<i>Bacillus gien-sis/Strepomyces viridochromogenes/Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto e Tolerante à Herbicida	Du Pont	2009
	Pro	MON89034	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a insetos	Monsanto	2009
	TL TG Viptera	Bt11 & MIR162 & GA21	<i>Bacillus thuringiensis/Streptomyces viridochromogenes/Zea Mays</i>	Resistente a insetos e Tolerante à herbicida	Syngenta	2010
	PRO2	MON89034 7 NK603	<i>Bacillus gien-sis/Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a insetos e Tolerante à herbicida	Monsanto	2010
	Yield Gard VT	MON88017	<i>Agrobacterium tumefaciens/Bacillus thuringiensis</i>	Tolerante à Herbicida e Resistência a insetos	Monsanto	2010

“Tabela 2, continuação”

Produto	Nome Comercial	Eventos	Organismo Doador	Característica	Requerente	Ano de Aprovação
Milho	Power Core PW/Dow	MON89034 & TC1507 & NK603	<i>Bacillus gien-sis/Streptomyces viridochromogenes/Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a insetos e Tolerante à herbicida	Monsanto e Dow Agros-ciencies	2010
	HX YG RR2	MON810 & TC1507 & NK603	<i>Bacillus gien-sis/Streptomyces viridochromogenes/Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante à Herbicida e Resistência a insetos	Du Pont	2011
	TC1507xMON810	TC1507 & MON810	<i>Bacillus gien-sis/Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante à Herbicida e Resistente a insetos	Du Pont	2011
	MON89034 x MON88017	MON89034 & MON88017	<i>Bacillus gien-sis/Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante à Herbicida e Resistente a insetos	Monsanto	2011

“Tabela 2, continuação”

Produto	Nome Comercial	Eventos	Organismo Doador	Característica	Requerente	Ano de Aprovação
Algodão	Bolgard I	MON531	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a insetos	Monsanto	2005
	Roundup Ready	MON1445	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante à Herbicida	Monsanto	2008
	Liberty Link	LLCotton25	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante à Herbicida	Bayer	2008
	Bolgard I Roundup Ready	MON531&MON1445	<i>Bacillus gien-sis/Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante à herbicida resistência a insetos	Monsanto	2009
	Widestrike	281-24-236 & 3006-210-23	<i>Bacillus gien-sis/Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante à herbicida resistência a insetos	Dow Agros-ciencias	2009
	Bolgard II	MON15985	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a Insetos	Monsanto	2009
	GlyTol	GHB614	<i>Zea mays</i>	Tolerante à herbicida	Bayer	2010
	TwinLink	T304-40 &	<i>Bacillus thuring-</i>	Resistente a insetos e	Bayer	2011

		GHB119	<i>gien- sis/Streptomyces hygroscopicus</i>	Tolerante à herbicida		
	MON88913	MON88913	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante à Herbicida	Monsanto	2011

“Tabela 2, conclusão”

Produto	Nome Comercial	Eventos	Organismo Doador	Característica	Requerente	Ano de Aprovação
Algodão	GlytolxTwinLink	GHB614 x T304-40 x GHB 119	<i>Zea may/Bacillus thurin- giensis/Streptomyc es higroscopicus</i>	Tolerante à herbicida e reistência a insetos	Bayer	2012
	GTxLL	GHB614 x LLCotton25	<i>Zea ma- ys/Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante à Herbicida	Bayer	2012
	BolgardII Roundup Ready Flex	MON 15985 x MON 88913	<i>Bacillus thurin- gien- sis/Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante à Herbicida e Resistente a insetos	Monsanto	2012
Feijão	Embrapa 5.1	Embrapa 5.1	BGMV - Bean Golden Mosaic Virus	Resistente ao Vírus do Mosaico dourado do feijoeiro	Embrapa	2011

Fonte: Tabela adaptada de CTNBIO (2013).

3.7.1 Cana-de-açúcar geneticamente modificada

Vários projetos de pesquisa estão focados atualmente no desenvolvimento da cana-de-açúcar geneticamente modificada – GM (ARRUDA, 2012; LAKSHMANAN et al., 2005; MOREA; JESUS; NOGUEIRA, 2012; SOUZA, D., 2010). Os primeiros ensaios a campo no mundo com cana transgênica começaram em 1999 e, no Brasil, os primeiros testes a campo foram realizados pela empresa CanaVialis/Monsanto em 2005, seguido pelo CTC em 2007. As principais características estudadas incluem tolerância a herbicidas, resistência a vírus, resistência à seca, tolerância a insetos-praga e maior teor de açúcar. Entre as canas GM, em desenvolvimento no mundo, as características mais visadas pelas empresas e instituições são aquelas que aumentam a produtividade (níveis mais elevados de sacarose), aquelas que mantêm produção em terras marginais, tolerando e suportando períodos de estiagem e por último as que apresentam resistência ao complexo de brocas. Além destas, outras características de interesse podem ser consultadas na (Tabela 3).

Tabela 3 Plantas transgênicas de cana-de-açúcar desenvolvidas para alto conteúdo de açúcar, resistência a insetos, herbicidas, vírus, estresses abióticos, entre outros

Característica	Promotor/ gene alvo	Promotor/ marcador de seleção	Referência
Resistência a insetos	CaMV 35S/CryIAb	Nos/Kan	Arencibia et al. (1997)
Resistência a insetos	UBI/CryIAb	CaMV 35S/Bar	Arvinth et al. (2010)
Resistência a insetos	UBI/CryIAC	UBI/G418	Weng et al. (2011)
Resistência a insetos	UBI/Gna	CaMV 35S/Kan	Setamou et al. (2002)
Resistência a insetos	UBI/Aprotinin	CaMV 35S/Hpt	Christy et al. (2008)
Resistência a insetos	UBI/SKTI e SBBI	UBI/G418	Falco e Silva Filho (2003)
Resistência à herbicida	UBI/Bar	CaMV 35S/Kan	Manickavasagam et al. (2004)
Resistência à herbicida	UBI/Bar	CaMV 35S:OCS:Actin1/Kan	Enriquez-Obregon et al. (1998)
Resistência à herbicida	CaMV 35S/Bar	UBI/Kan	Falco, Tulmann Neto e Ulian (2000)
Resistência ao vírus SCYLV	UBI/CP	UBI/Kan	Zhu et al. (2011)

“Tabela 3, continuação”

Característica	Promotor/ gene alvo	Promotor/ marcador de seleção	Referência
Resistência ao vírus SCYLV	UBI/CP	UBI/Kan	Gilbert et al. (2009)
Resistência ao vírus SCYLV	UBI/CP	UBI/Kan	Gilbert et al. (2005)
Resistência ao vírus SrMV	UBI/CP	UBI/Kan	Ingelbrecht, Irvine e Mirkov (1999)
Resistência ao vírus FDV	UBI/FDVS9 ORF1	UBI/Kan	McQualter et al. (2004)
Resistência à escaldadura das folhas	UBI/albD	Emu/G418	Zhang et al. (1999)
Resistência a <i>Puccinia melanocephala</i>	UBI/Glucanase, quitinase e ap24	CaMV 35S/Kan	Enriquez et al. (2000)
Tolerância à seca	AIPC/P5CS	CaMV 35S/Bar	Molinari et al. (2007)
Tolerância à seca	CaMV 35S/TS	CaMV 35S/Bar	Zhang et al. (2006)
Tolerância ao frio	COR15a/ipt	Emu/G418	Belintani et al. (2012)
Aumento no conteúdo de açúcares	CaMV 35S/PFP	UBI/Kan	Groenewald e Botha (2008)
Aumento da trehalulose	UBI/TS	Ubi/Kan	Hamerli e Birch (2011)
Aumento no conteúdo de açúcares	Emu/SSFT	Emu/Kan	Hellwege e Knuth (2007)

“Tabela 3, conclusão”

Característica	Promotor/ gene alvo	Promotor/ marcador de seleção	Referência
Aumento no conteúdo de açúcar	UBI/SI	UBI/Kan	Wu e Birch (2007)
Aumento no conteúdo de isomaltulose	Emu/SCINVm e SUC2	Emu/Kan	Ma et al. (2000)
Alteração na cor do mosto	Emu/Ppo	Emu/Kan	Vickers et al. (2005)
Produção de bioplásticos	UBI/phbA, phbB, phaC2, FatB2, KasA1 e phaJ2	UBI/Kan	Anderson et al. (2011)
Aumento da digestibilidade	CaMV 35S/Appa	Nos/Kan	Santosa et al. (2004)

Muitas empresas multinacionais e nacionais estão incluindo em seu *pipeline* outras características de importância agroindustrial (Tabela 4). Assim, novas ferramentas biotecnológicas estão produzindo resultados encorajadores nas áreas de caracterização do genoma, mapeando características úteis. Entre elas estão os avanços na caracterização molecular de patógenos da cultura, identificação de marcadores associados à resistência a insetos/doenças importantes, uso de engenharia de precisão (ZFNs, TALENs, *mini-chromosome gene stacking technology*), detecção precisa de patógenos na cultura, entre outros. O aumento da sensibilidade permitiu que os ensaios de detecção e identificação dos patógenos se tornassem mais rápidos e econômicos.

Geralmente, o desenvolvimento de uma nova variedade convencional de cana leva de 12 a 15 anos, mas, com o crescente avanço das pesquisas em biologia molecular, genética e fisiologia, uma variedade geneticamente modificada pode ser alcançada dentro de 4 anos. Entretanto, cada evento geneticamente modificado necessita ser avaliado para os possíveis impactos ambientais. No Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) aprovou mais de quarenta ensaios em campo com cana-de-açúcar geneticamente modificadas para aumento da produção, tolerância à seca, herbicidas e resistência à insetos. Essas PGMs foram geradas por instituições de P&D públicas e privadas (CHE-VEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Tabela 4 Características de interesse ao setor sucroalcooleiro energético

Resistência ao raquitismo da soqueira
Resistência ao complexo brocas (broca do colmo e broca gigante)
Resistência a nematoides
Tolerância ao alagamento
Tolerância ao frio
Adaptação a altas temperaturas
Tolerância à compactação
Tolerância ao alumínio
Eficiência no uso de nutrientes (nitrogênio e fósforo)
Resistência a outras classes de herbicidas (glifosato, 2,4-D, dicamba, imidazolinonas e combinação entre eles)
Alto conteúdo de açúcar total recuperável (ATR) em variedades precoces, médias e tardias
Modificação da parede celular visando ao aumento da digestibilidade da biomassa

Algumas estratégias são normatizadas pela CTNBio para limitar o fluxo gênico. É necessária a adoção de medidas de prevenção para evitar imprevistos nos ensaios a campo. Pode ocorrer evolução de resistência em organismos alvo/não-alvo, se houver exposição a doses subletais de toxinas produzidas pelos clones transformados, especialmente cana-de-açúcar contendo genes *Cry*. De acordo com o Comunicado nº 07, de 21 de outubro de 2010 da CTNBio (BRASIL, 2010), medidas devem ser adotadas para conter o fluxo gênico nos locais de experimentação com cana GM da seguinte forma:

- a) Bordadura com linhas duplas de cana-de-açúcar convencional, ao redor dos experimentos.
- b) Manter distância de 3 metros com vegetação de cobertura rasteira, a partir da linha de bordadura mais externa.
- c) Adicionalmente, para as regiões Norte e Nordeste do Brasil, os experimentos com cana-de-açúcar geneticamente modificada devem distar em pelo menos 100 metros da bordadura mais externa de blocos

de cruzamentos de cana-de-açúcar de programas de melhoramento exclusivamente convencionais.

- d) Eliminar panículas florais incipientes das plantas geneticamente modificadas, em liberações planejadas no meio ambiente que não se destinam a cruzamentos controlados (melhoramento genético).
- e) Biomassa produzida pelos experimentos com cana-de-açúcar geneticamente modificada deverá ser descartada em destilarias ou trituradas e enterradas em valas de áreas com CQB.

Em função dos obstáculos encontrados em espécies recalcitrantes à transformação genética por *Agrobacterium*, utiliza-se frequentemente o método de biobalística (bombardeamento de partículas) onde o transgene é diretamente implantado aleatoriamente em uma variedade de compartimentos celulares. Contudo, a primeira técnica citada demonstra diversas vantagens em relação à biobalística: maior estabilidade na integração de uma única cópia do transgene no genoma com reduzido número de rearranjos, menor probabilidade de silenciamento gênico e co-supressão (CARRER et al., 1993; CHRISTOU; FORD; KOFFRON, 1991; DATTA et al., 1990; ENRIQUEZ-OBREGON et al., 1997, 1998; FROMM et al., 1990; GORDON-KAMM et al., 1990; SVAB; HAJDUKIEWICZ; MALIGA, 1990; TORIYAMA et al., 1988). Atualmente, vários genes foram introduzidos em cana-de-açúcar utilizando ambos os métodos de transformação (Tabela 5).

Tabela 5 Cana-de-açúcar geneticamente modificada pelos métodos de transformação biobalística e *Agrobacterium*

Genes	Função	Método de transformação	Autores
<i>hpt</i>	Resistência à higromicina	<i>Agrobacterium</i>	Arencibia et al. (1999)
<i>bar</i>	Resistência a glufosinato de amônio	<i>Agrobacterium</i>	Manickavasagam et al. (2004)
<i>npII</i>	Resistência à canamicina	Biobalística	Bower e Birch (1992)
<i>SCMV-CP</i>	Resistência a doenças	Biobalística	Joyce et al. (1998)
<i>SrMV-CP</i>	Resistência a doenças	Biobalística	Ingelbrecht, Irvine e Mirkov (1999)
<i>FDVS9 ORF 1</i>	Resistência a doenças	Biobalística	Mcqualter et al. (2004)
<i>cryIA</i>	Resistência a pragas	Biobalística	Arencibia et al. (1999)
<i>cryIAb</i>	Resistência a pragas	Biobalística	Arvinth et al. (2010) e Braga et al. (2003)
<i>P5CS</i>	Tolerância a estresses abióticos	Biobalística	Molinari et al. (2007)
<i>phaA, phaB, phaC</i>	Produção de biopolímeros	Biobalística	Brumbley et al. (2008)
<i>IsdA</i>	Metabolismo de sacarose	<i>Agrobacterium</i>	Enriques et al. (2000)

O método de transformação mediado por *Agrobacterium* tem sido muito utilizado em plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas. Porém, ainda muitas monocotiledôneas são recalcitrantes a esse método de transformação

As dificuldades encontradas na transformação de monocotiledôneas, via *Agrobacterium*, inclui ausência ou baixos níveis de excreção de indutores *vir*. Os tecidos lesionados tornam-se lignificados formando uma barreira física à infecção. Além disso, as células meristemáticas dessas espécies monocotiledôneas perdem a capacidade de diferenciação mais rapidamente (BHATTACHARYA; SOOD, 2011; GRAVES et al., 1988; KAHL, 1982; MAHALAKSHMI; KHURANA, 1997).

A transformação genética mediada por *Agrobacterium* em cana-de-açúcar já está sendo utilizada por vários grupos de pesquisa no Brasil e no mundo, principalmente, as empresas multinacionais. Progressos nesta tecnologia podem ajudar a resolver questões regulatórias associadas à integração do transgene. Isto pode fornecer algum caminho ao entendimento sobre os mecanismos de silenciamento do transgene na cana-de-açúcar, ainda há muito a ser compreendido sobre a estabilidade genética em longo prazo.

3.8 Mecanismos moleculares de tolerância ao déficit hídrico

Estresses abióticos como o frio, déficit hídrico e alta salinidade são condições comuns que afetam o crescimento e a produtividade das mais variadas culturas. O desenvolvimento adaptativo ao estresse é dependente da ativação de uma cascata de redes moleculares envolvida na percepção do estresse, sinal de transdução, expressão de genes estresse-regulados e metabólitos. As plantas têm respostas adaptativas estresse-específicas, assim como respostas de proteção a mais de uma condição ambiental. Os sinais de percepção e rotas de sinalização podem ser específicos ou sofrerem cross-talk, sendo ativas em períodos de estresse

distintos, podendo até mesmo haver vias cruzadas entre fatores estressantes no âmbito biótico e abiótico ao mesmo tempo (Figura 2). Esta cascata de ativação coordena e controla respostas fisiológicas e bioquímicas adaptativas necessárias (HUANG et al., 2012).

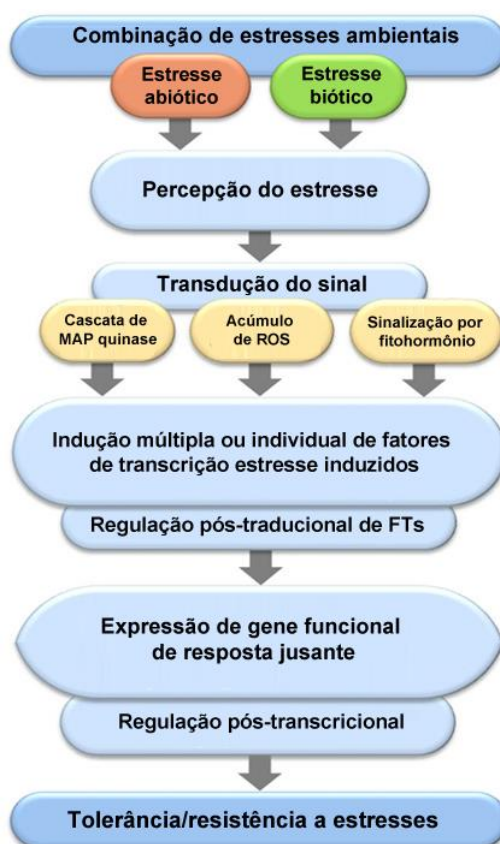


Figura 2 Eventos-chave na via de transdução de sinal ativada em resposta a estresses bióticos e abióticos combinados

Fonte: Atkinson e Urwin (2012)

Análises de transcriptoma, usando tecnologia de microarranjo, revelaram que genes induzidos por estresse poderiam ser caracterizados em dois gru-

pos de acordo com suas funções. O primeiro grupo consiste em proteínas funcionais, assim como as proteínas de membrana que mantêm o movimento por meio destas enzimas-chave para biossíntese de osmólitos (prolina, betaína e açúcares), enzimas de detoxificação celular (glutathiona S-transferase, hidrolases, catalases, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase) permitindo níveis normais do metabolismo fisiológico e bioquímico e proteínas de proteção de macromoléculas (proteínas LEA, osmotinas, proteínas anticongelamento, chaperonas). O segundo grupo compreende as proteínas regulatórias, compõem este grupo os fatores de transcrição (*bZIP*, *MYC*, *MYB* e *DREB*, entre outras), proteínas quinases (MAP Kinase, CDP Kinase, receptores de proteínas quinase, proteínas-ribossomais quinase e proteínas quinase de regulação-transcrição) e proteínas (fosfoesterases e fosfolipase C, entre outras) (Figura 3).

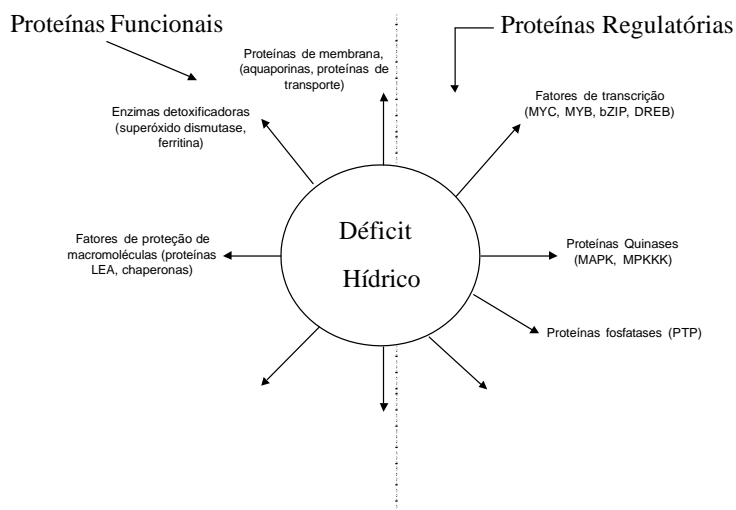


Figura 3 Genes induzidos durante o estresse hídrico e suas possíveis funções na resposta e tolerância ao estresse

Fonte: (MOLINARI, 2006).

Os FTs interagem com os elementos *cis* atuantes presentes na região promotora de vários genes estresse-induzidos e esta super-regulação gênica da expressão de muitos genes resultam na transmissão da tolerância ao estresse (Figura 4).

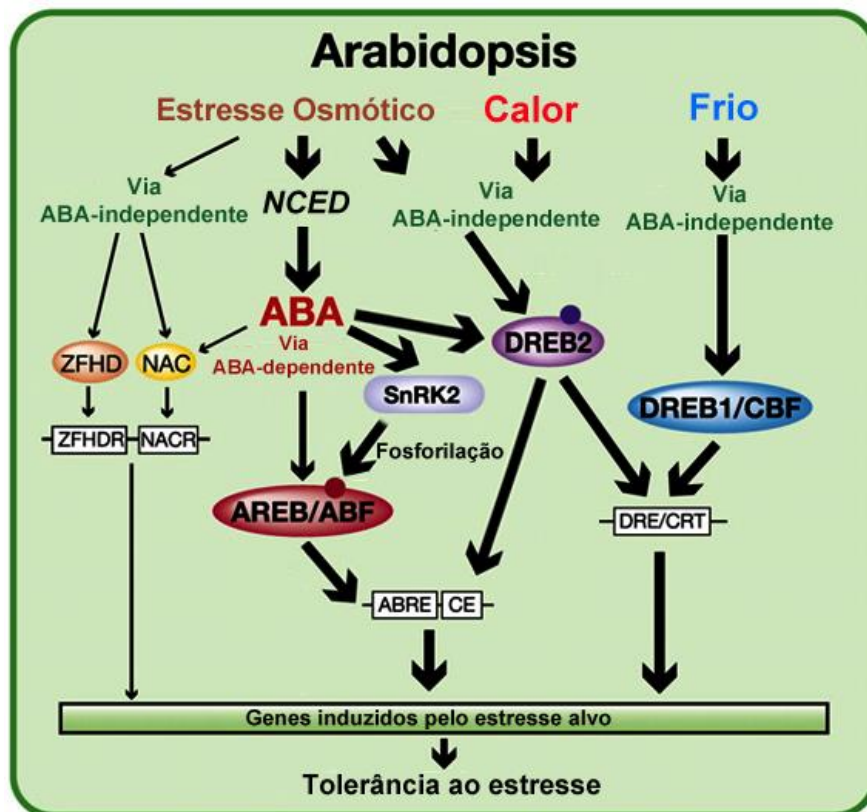


Figura 4 Rede de regulação transcricional de elementos cis-atuantes e fatores de transcrição ABA-dependentes envolvidos no frio, a seca e a expressão gênica estresse salino

Fonte: Huang et al. (2012)

3.8.1 Fatores de transcrição

Os fatores de transcrição participam na cascata de ativação gênica de diversas vias metabólicas relacionadas a estresses bióticos e abióticos. Os fatores de transcrição DREB (***D**ehydration **R**esponsive **E**lement **B**inding protein*): são importantes na ativação de genes funcionais relacionados à tolerância à seca, salinidade, frio e calor (NAKASHIMA et al., 2007; SAKUMA et al., 2006). O estresse em plantas inicia-se, a partir de uma complexa via de respostas, começando com a percepção do estresse, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares, sendo finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (BRAY, 1993).

Mudanças de expressão gênicas, induzidas por estresse, por sua vez podem participar na geração de fitohormônios tais como ABA, ácido salicílico e etileno. Estas moléculas podem amplificar os sinais e induzir um segundo *round* de sinalização podendo seguir a mesma via metabólica ou usar outra via de sinalização.

Inúmeros FTs atuam na resposta ao estresse, alguns são dependentes de ABA e outros não, tais vias são denominadas ABA-dependente ou ABA-independente quando assim são ativadas. Existem elementos que são induzidos por ambas as vias, podendo ocorrer respostas cruzadas entre estas diferentes vias de sinalização (LEUNG; MERLOT; GIRAUDAT, 1997; WANG et al., 2008). Além das respostas cruzadas em vias ABA, podem ocorrer em nível da atividade/função gênica, visto que alguns FT são induzidos ou contribuem indiretamente na tolerância a diferentes estresses, biótico e abiótico (AGARWAL; JHA, 2010).

3.9 DREB2A

Os *DREBs* (Dehydration Responsive Element Binding- Elemento responsivo ligado à desidratação) são importantes FT que regulam a expressão de muitos genes estresse-induzidos, principalmente em vias ABA-dependente, têm papel importante na tolerância de plantas ao estresse abiótico por interagirem com DRE/CRT (elementos *cis*) presente na região promotora de inúmeros genes estresses responsivos (LATA; PRASAD, 2011).

O DREB2A e DREB2B são induzidos, principalmente, por excesso de salinidade ou déficit hídrico. Em estudos recentes verificou-se que o DREB2A, também, é ativo pela presença de ABA, ou seja, ele participa das duas, ABA-dependente e independente (DUBOUZET et al., 2003; LIU et al., 2008).

Liu et al. (1998) sugeriram que proteínas DREB2A requerem modificação pós-traducionais, como a fosforilação, para efetiva ativação gênica. A superexpressão de DREB2A não resultou em quaisquer modificações fenotípicas em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, ou seja, nenhuma alteração do crescimento ou qualquer melhora na tolerância ao estresse. Busk, Jensen e Pages (1997), também, relataram que a fosforilação é necessária para a ativação destas proteínas sob condições de estresse.

A região C-terminal do *DREB2A* é rica em aminoácidos e a partir disso foi concretizado um estudo sobre o domínio de ativação do DREB2A por Sakuma et al. (2006). Neste trabalho, foram realizadas análises do domínio da proteína DREB2A e verificou-se que a região C-terminal atuava como um domínio de ativação da transcrição, e que as suas funções na regulação negativa da atividade do DREB2A situava-se na localização média do domínio conservado desta proteína. Foram realizadas várias deleções em regiões distintas do *DREB2A* e a que melhor apresentou resultado foi a construção *DREB2A CA*, a qual foi obtida por exclusão da região de fosforilação obrigatória do gene na posição entre o 135 e o

166 aminoácidos. Portanto, a estabilidade gênica, sem a obrigatoriedade do mecanismo de fosforilação garante ao *DREB2A* bom desempenho na indução de genes estresse-responsivos, que conferem a tolerância ao estresse.

3.9.1 Plantas transformadas com fatores de transcrição

São inúmeros os fatores de transcrição existentes que atuam nos estresses abiótico e biótico, dentre eles o C-Repeat Binding Factors - CBF (CBF1, CBF2, CBF3, CBF4, CBF2-1, CBF2-2) (CHINNUSAMY et al., 2003; GILMOUR et al., 1998; HAAKE et al., 2005; KUME et al., 2005; XIONG; FEI, 2006; ZARKA et al., 2003), membros da família AP2/EREBP, que atuam, principalmente, em baixas temperaturas (frio) ativando genes Cold-Regulated genes-COR (*COR78/RD29A*; *COR47*; *COR15a*, *COR 6.6*) (STOCKINGER; GILMOUR; THOMASHOW, 1997; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOKAKI, 1994); Dehydration Responsive Element Binding- DREB1/DREB2 (DREB1a, DREB1b, DREB1c, DREB2A, DREB2B); que atuam em situações de déficit hídrico, frio e alta salinidade; NAC (NAC2, NAC019, NAC055, NAC072, NAC6, NAC1, NAC2, NAC23) (FUJITA et al., 2004; HERR, 2005; HU et al., 2006; NAKASHIMA et al., 2007; OHNISHI et al., 2005; TRAN et al., 2004) e Basic Leucine Zipper - bZIP (ABF1, ABF2, ABF3, ABF4, bZIP 44, bZIP 62, bZIP78, bZIP132) que respondem a condições de estresse abiótico e biótico (como defesa contra patógenos) (CHOI et al., 2000; DEPPMANN et al., 2006; JAKOBY et al., 2002; LIAO et al., 2008a); MYC (Myelocytosis oncogene)/MYB (Myeloblastosis oncogene) (MYB2, MYB76, MYB92, MYB177) (ABE et al., 1997; AGARWAL et al., 2006; LIAO et al., 2008b) que, também, são induzidos pelos estresses relacionados ao DREB.

Alguns elementos específicos induzem pelo seu sinal particular a expressão de fatores de transcrição alvo, é o caso do gene ICE (*ICE1*, *ICEr*, *ICEr1*)

que ativam a expressão dos membros CBFs (ZARKA et al., 2003). Já os *DREBs* e outros fatores de transcrição não possuem esta característica, são acionados por inúmeras moléculas e respostas.

Vários trabalhos relatam conclusões positivas para tolerância ao estresse em relação ao desempenho dos fatores de transcrição. A superexpressão do *AtCBF1* ou *AtCBF3* tanto em construções estresse-induzidas como constitutivas em plantas transgênicas de *Brassica* (JAGLO et al., 2001); tomate (HSIEH et al., 2002); tabaco (KASUGA et al., 2004); trigo e arroz (OH et al., 2005) proporcionam tolerância ao frio. Em outros estudos relacionados ao mesmo gene, a superexpressão e respostas em arroz (DUBOUZET et al., 2003); milho (QIN et al., 2004) também foram semelhantes. Em *Arabidopsis* *DREB1A* transgênica foi possível observar a indução constitutiva da expressão dos genes *COR* (alvos do CBF) (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2006).

Alguns genes como *DREB* foram inseridos em plantas e essas tiveram aumento significativo na tolerância ao calor, desidratação e salinidade (Tabela 6).

Tabela 6 Plantas geneticamente modificadas (*DREB*)

Genes	Espécies	Plantas transgênicas	Estresse-tolerância	Referência
<i>AtDREB1A</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis	Déficit hídrico	Liu et al. (1998)
<i>AtDREB1A</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tobacco	Déficit hídrico, frio	Kasuga et al. (2004)
<i>AtDREB1A</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Wheat	Déficit hídrico	Pellegrineschi et al. (2004)
<i>AtDREB1A</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Rice	Déficit hídrico, Salinidade	Oh et al. (2005)
<i>AtDREB1A</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Potato	Salinidade	Behnam et al. (2006)
<i>AtDREB1A</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Peanut	Déficit hídrico	Bhatnagar-Mathur et al. (2006)
<i>AtDREB2ACA</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis	Déficit hídrico	Sakuma et al. (2006)
<i>AtDREB2C</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis	Termotolerância	Lim et al. (2007)
<i>OsDREB1A</i>	<i>Oryza sativa</i>	Arabidopsis	Déficit hídrico, Salinidade, frio	Dubouzet et al. (2003)
<i>OsDREB2B</i>	<i>Oryza sativa</i>	Arabidopsis	Déficit hídrico, Termotolerância	Matsukura et al. (2010)
<i>OsDREB1F</i>	<i>Oryza sativa</i>	Rice, Arabidopsis	Déficit hídrico, Salinidade, frio	Wang et al. (2008)
<i>OsDREB1G</i>	<i>Oryza sativa</i>	Rice	Déficit hídrico	Chen et al. (2008)
<i>ZmDREB2A</i>	<i>Zea mays</i>	Arabidopsis	Déficit hídrico, Termotolerância	Qin et al. (2007)
<i>PgDREB2A</i>	<i>Pennisetum glaucum</i>	Tobacco	Hiperiônico, hiperosmótico	Agarwal et al. (2010)
<i>AhDREB1</i>	<i>Artiplex hortensis</i>	Tobacco	Déficit hídrico, Salinidade	Shen et al. (2003)
<i>GhDREB1</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Tobacco	Frio	Shan et al. (2007)
<i>PeDREB2</i>	<i>Populus euphratica</i>	Tobacco	Salinidade	Chen, Xia e Yin (2009)
<i>HvDREB1</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Arabidopsis	Salinidade	Xu et al. (2009)

3.10 Gene induzido por estresse abiótico (*ZmRab17*)

O gene *Rab17* de milho pertence ao grupo dos genes *LEA/DHN*, induzido por ABA e déficit hídrico (VILARDELL et al., 1990). O promotor do *Rab17* de milho foi testado em alguns sistemas heterólogos. O promotor, em transformação estável de tabaco e expressão transiente em protoplasto de arroz, mostrou que, em ambos os casos, o promotor foi induzido tanto pela seca e quanto pelo tratamento com ABA (VILARDELL et al., 1991). Tal indução foi inicialmente explicada pela presença do elemento ABRE em um segmento de 100 pb na região promotora. Em outro estudo, alguns *cis*-elementos (5 ABREs putativos e 4 outras sequências) importantes para alta atividade foram mapeadas no promotor. Seis destes elementos demonstraram ser importantes para expressão em embriões, enquanto apenas 3 elementos eram responsáveis pela expressão basal e estresse-induzida em folhas. Dentre estes elementos, foi identificado um novo elemento ativador de *Rab* rico em GC, CACTGGCCGCC, responsável pela baixa expressão constitutiva do *Rab17* em folhas de milho e dos elementos responsivos a seca (DREs) (BUSK; JENSEN; PAGES, 1997). Finalmente, foi encontrado que o promotor *ZmRab17* é ativado por ABA, estresses hídrico e salino por meio de um único elemento DRE (DRE2). Dois domínios APETALA 2 (AP2), contendo os fatores de transcrição, denominados DRE Binding factor (DBF1 e DBF2), foram isolados e a ativação do promotor pela super-expressão de DBF1 e repressão pela super-expressão de *DBF2* foi demonstrada (KIZIS; PAGES, 2002). Os resultados apresentados por Kizis e Pages (2002) sugerem que o promotor *Rab17* pode ser utilizado na superexpressão dos fatores de transcrição *DREB* induzida pela seca. O promotor é forte, tem baixa atividade basal em milho, a indução do promotor inicia em algumas horas após a planta perceber o déficit hídrico e sua atividade retorna rapidamente o nível basal após a reidratação.

REFERÊNCIAS

ABE, H. et al. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 10, p. 1859-1868, Oct. 1997.

ABROUK, M. et al. Palaeogenomics of plants: synteny-based modelling of extinct ancestors. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 9, p. 479-487, Sept. 2010.

AGARWAL, P. K. et al. Role of DREB transcription factor in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 12, p. 1263-1274, Dec. 2006.

AGARWAL, P. K.; JHA, B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling: Central Salt and Marine Chemicals Research Institut, India. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 54, n. 2, p. 201-212, June 2010.

ANDERSON, D. J. et al. Synthesis of short-chain-length/medium-chain length polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymers in peroxisomes of transgenic sugarcane plants. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, n. 3/4, p. 170-184, Dec. 2011.

ARENCIBIA, A. et al. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, London, v. 7, n. 3, p. 213-222, May 1997.

ARENCIBIA, A. et al. Somaclonal variation in insect resistant transgenic sugarcane (*Saccharum* hybrid) plants produced by cell electroporation. **Transgenic Research**, London, v. 8, n. 5, p. 349-360, Oct. 1999.

ARRUDA, P. Genetically modified sugarcane for bioenergy generation. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 23, n. 3, p. 315-322, June 2012.

ARVINTH, S. et al. Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with cry1Ab for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 4, p. 383-395, Apr. 2010.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE VEÍCULOS AUTOMOTORES. **Carta da ANFAVEA 2012/2011**. Disponível em: <<http://www.anfavea.com.br/cartas/Carta320.pdf>>. Acesso em: 6 jun. 2013.

ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 10, p. 1-21, June 2012.

BANDURSKA, H. Does proline accumulated in leaves of water deficit stressed barley plants confine cell membrane injury?: I., free proline accumulation and membrane injury index in drought and osmotically stressed plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Pozann, v. 22, n. 4, p. 409-415, 2000.

BANDURSKA, H.; GOŃRNY, A. G.; ZIELEZIN'SKA, M. Effects of water deficit on relative water content, proline accumulation and injury of cell membranes in leaves of old and modern cultivars of winter wheat. **Zeszyty Problemowe Postępowania Nauk Rolniczych- ZPPNR**, Warszawa, v. 524, n. 1, p. 115-126, 2008.

BAULCOMBE, D. C.; ENGLISH, J. J. Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 7, n. 2, p. 173-180, Apr. 1996.

BEHNAM, B. et al. The Arabidopsis DREB1A gene driven by the stress-inducible rd29A promoter increases salt-stress tolerance in proportion to its copy number in tetrasomic tetraploid potato (*Solanum tuberosum*). **Plant Biotechnology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 169-177, 2006.

BELINTANI, N. G. et al. Improving low-temperature tolerance in sugarcane by expressing the *ipt* gene under a cold inducible promoter. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 56, n. 1, p. 71-77, 2012.

BHATNAGAR-MATHUR, P. et al. Over-expression of Arabidopsis thaliana DREB1A in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) for improving tolerance to drought stress (poster presentation). In: SACKLER, A. M. (Ed.). **Colloquia on 'From functional genomics of model organisms to crop plants for global health'**. Washington: National Academy of Sciences, 2006. p. 3-5.

BHATTACHARYA, P.; SOOD, A. Problems and possibilities of monocot transformation. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 55, n. 1, p. 1-15, 2011.

BLUM, A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. In: BELHASSEN, E. (Ed.). **Drought tolerance in higher plants: genetical, physiological and molecular biological analysis**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 57-70.

BOHNERT, H. J. et al. A genomics approach towards salt stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 39, n. 3, p. 1-17, 2001.

BORBA, M. M. Z.; BAZZO, A. M. **Estudo econômico do ciclo produtivo da cana-de-açúcar para reforma de canavial, em área de fornecedor do Estado de São Paulo**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2009. 21 p.

BOWER, R.; BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant Journal**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 409-416, May 1992.

BRAGA, D. P. V. et al. Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, London, v. 5, n. 2/3, p. 209-221, 2003.

BRANDES, E. W. A rapid method for propagation of seed cane. **Sugar Bulletin**, New Orleans, v. 4, n. 15, p. 2-4, 1926.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Comunicado nº 07**, de 21 de outubro de 2010 da CTNBio - 47. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15622.html>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Matriz energética nacional 2030**. Brasília, 2007. 252 p.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit'. **Plant Physiology**, Riverside, v. 103, n. 4, p. 1035-1040, Dec. 1993.

BRUMBLEY, S. M. et al. Sugarcane. In: KOLE, C.; HALL, T. C. (Ed.). **A compendium of transgenic crop plants**. Oxford: Blackwell, 2008. p. 1-58. (Sugar Tuber and Fiber Crops, 7).

BUSK, P. K.; JENSEN, A. B.; PAGES, M. Regulatory elements *in vivo* in the promoter of the abscisic acid responsive gene *rab17*. from maize. **Plant Journal**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 1285-1295, June 1997.

CARRER, H. et al. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 241, n. 1/2, p. 49-56, Oct. 1993.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Censo varietal e de produtividade de 2011**. Disponível em:

<http://www.ctcanavieira.com.br/downloads/CTC%20_Censo2011-12baixa.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2012.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento em cana-de-açúcar**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2004. 121 p.

CHAVES, M. M. Effects of water stress on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 1-16, 1991.

CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to waater deficits: propects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 407, n. 10, p. 2365-2384, 2004.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, Brasília, v. 4, n. 1, p. 62-89, Mar. 2011.

CHEN, H.; JIANG, J. G. Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. **Environmental Reviews**, Ottawa, v. 18, p. 309-319, Dec. 2010.

CHEN, J.; XIA, X.; YIN, W. Expression profiling and functional characterization of a DREB2-type gene from *Populus euphratica*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 378, n. 3, p. 483-487, Jan. 2009.

CHEN, J. Q. et al. Overexpression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, n. 12, p. 2191-2198, Dec. 2008.

CHINNUSAMY, V. et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 17, n. 8, p. 1043-1054, Apr. 2003.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Gene regulation during cold acclimation in plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, n. 1, p. 52-61, 2006.

CHOI, H. et al. ABFs, a family of ABA responsive element binding factors. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 3, p. 1723-1730, Jan. 2000.

CHRISTOU, P.; FORD, T. L.; KOFRON, M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 9, n. 10, p. 957-962, 1991.

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

COMISSÃO TÉCNICA DE BIOSSEGURANÇA. **Tabela geral de plantas geneticamente modificadas aprovadas comercialmente**. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0001/1736.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira, cana-de-açúcar: primeiro levantamento 2012**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_10_09_19_04_boletim_de_cana.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira, cana-de-açúcar, safra 2013/2014 primeiro levantamento, 2013.** Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_29_31_boletim_cana_portugues_abril_2013_1o_lev.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2013.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA. **Bioetanol: o futuro renovável.** Brasília, 2012. Disponível em:

<http://www.cnisustentabilidade.com.br/docs/FNS_RIO20_web.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2013.

CORNIC, G.; BRIANTAIS, J. M. Partitioning of electron flow between CO₂ and O₂ reduction in a C₃ leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentration and during drought stress. **Planta**, Berlin, v. 183, n. 2, p. 178-184, Jan. 1991.

CORNIC, G.; MASSACCI, A. Leaf photosynthesis under drought stress. In: BAKER, N. R. (Ed.). **Photosynthesis and the environment.** Wageningen: Kluwer Academic, 1996. p. 347-366.

CRUSIOL, L. G. T.; CARVALHO, J. F. C.; FARIAS, J. R. B. **Análise da disponibilidade hídrica na fazenda da Embrapa Soja (Londrina, PR) nas safras de 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012.** Londrina: EMBRAPA Soja, 2012. 9 p.

DACOSTA, M.; HUANG, B. R. Osmotic adjustment associated with variation in bentgrass tolerance to drought stress. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 131, n. 3, p. 338-344, 2006.

DANIELS, J.; SMITH, P.; PATON, N. Working notes on the current status of *S. robustum*. **Sugarcane Breeding Newsletter**, Macknade, v. 36, p. 40-44, 1975.

DATTA, S. K. et al. Genetically engineered fertile indica-rice recovered from protoplasts. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 14, n. 3, p. 315-319, 1990.

DAVIDSON, E. H. **The regulatory genome: gene regulatory networks in development and evolution**. New York: Academic, 2006. 304 p.

DEPPMANN, C. D. et al. Cross-species annotation of basic leucine zipper factor interactions: insight into the evolution of closed interaction networks. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 1480-1492, 2006.

DESIKAN, R. et al. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signaling in stomatal guard cell. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 205-212, Feb. 2004.

DHANDA, S. S.; SETHI, G. S.; BEHL, R. K. Indices of drought tolerance in wheat genotypes at early stages of plant growth. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 190, n. 1, p. 6-12, 2004.

DUBOUZET, J. G. et al. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt-, and cold-responsive gene expression. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 751-763, Feb. 2003.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balanco energético nacional 2012**: ano base 2011: síntese do relatório final. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em:
<https://ben.epe.gov.br/downloads/S%C3%ADntese%20do%20Relat%C3%B3rio%20Final_2012_Web.pdf>. Acesso em: 6 jun. 2013.

ENRIQUES, G. A. et al. Sugarcane (*Saccharum hybrid*) genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: production of transgenic plants expressing proteins with agronomic and industrial value. **Developments in Plant Genetics and Breeding**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 76-81, 2000.

ENRIQUEZ OBREGON, G. A. et al. Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. **Biotechnology Aplicada**, Rio Claro, v. 14, n. 2, p. 169-174, 1997.

ENRIQUEZ OBREGON, G. A. et al. Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**, Berlin, v. 206, n. 1, p. 20-27, Feb. 1998.

FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, n. 8, p. 761-766, Aug. 2003.

FALCO, M. C.; TULMANN NETO, A.; ULIAN, E. C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 12, p. 1188-1194, Dec. 2000.

FIGUEIRA, S. R.; BURNQUIST, H. L. **Perspectivas para o setor sucroalcooleiro brasileiro nos programas de álcool combustível da União Européia, Japão e Brasil**. Piracicaba: ESALQ, 2008. Disponível em: <<http://ideas.repec.org/p/ags/sbrfsr/109069.html>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **A ONU e a alimentação**. Disponível em: <<http://www.onu.org.br/a-onu-em-acao/a-onu-e-a-alimentacao/2013>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

FROMM, M. E. et al. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of maize plants. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 8, n. 9, p. 833-839, Sept. 1990.

FUJITA, M. et al. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. **Plant Journal**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 863-876, Sept. 2004.

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

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

GILMOUR, S. J. et al. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. **Plant Journal**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 433-442, Nov. 1998.

GORDON-KAMM, W. J. et al. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 7, p. 603-618, July 1990.

GRAVES, A. E. et al. Scanning electron microscope studies of *Agrobacterium tumefaciens* attachment to *Zea mays*, *Gladiolus* sp. and *Triticum aestivum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 9, p. 2395-2400, 1988.

GROENEWALD, J. H.; BOTHA, F. C. Down-regulation of pyrophosphate: fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase (PF6) activity in sugarcane enhances sucrose accumulation in immature internodes. **Transgenic Research**, London, v. 17, n. 1, p. 85-92, Mar. 2008.

HAAKE, V. et al. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 130, n. 4, p. 639-648, Aug. 2005.

HAMERLI, D.; BIRCH, R. G. Transgenic expression of trehalulose synthase results in high concentrations of the sucrose isomer trehalulose in mature stems of field-grown sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 32-37, Jan. 2011.

HANSON, A. D.; HITZ, W. D. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 33, p. 163-203, 1982.

HELLWEGE, E.; KNUTH, K. **Sugarcane plants with increase storage carbohydrates content**. US n. EP1831378 A2, 21 Dec. 2005, 12 Sept. 2007.

HERR, A. J. **Pathways through the small RNA world of plants**. Wageningen: FEBS National Institute of General Medical, 2005. Disponível em: <<http://www.nigms.nih.gov/News/Extras/RNAi/factsheet.htm>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

HONT, A. d' et al. Characterization of the double genomes structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 250, n. 3, p. 405-413, Sept. 1996.

HONT, A. d' et al. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, Ottawa, v. 41, n. 2, p. 221-225, Feb. 1998.

HSIAO, T. C. Plant response to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 24, p. 519-70, 1973.

HSIEH, T. H. et al. Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 129, n. 3, p. 1086-1094, July 2002.

HU, H. et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **Proceeding National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 35, n. 12, p. 12987-12992, 2006.

HUANG, G. T. et al. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. **Molecular Biological Reports**, London, v. 39, n. 2, p. 969-987, Feb. 2012.

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

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 377-403, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatística da produção agrícola novembro de 2012**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201211.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2013.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Combustível com futuro**: Brasil precisa investir para aproveitar crescimento do consumo mundial de álcool. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&view=article&id=1480:catid=28&Itemid=23>. Acesso em: 12 jan. 2013.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRIBIOTECH APPLICATIONS. **Global status of commercialized Biotech/GM crops**. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/executivesummary/default.asp>>. Acesso em: 6 jun. 2013.

JAGLO, K. R. et al 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**, Bethesda, v. 127, n. 3, p. 910-917, Nov. 2001.

JAKOBY, M. et al. *bZIP* transcription factors in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 106-111, Mar. 2002.

JANNOO, N. L. et al. Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, n. 1/2, p. 171-184, July 1999.

JAVADI, T.; ARZANI, K.; EBRAHIMZADEH, H. Study of proline, soluble sugar, and chlorophyll a and b changes in nine Asian and one European pear cultivar under drought stress. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 769, n. 1, p. 241-246, 2008.

JOYCE, P. A. et al. Transgenic sugarcane resistant to sugarcane mosaic virus. In: AUSTRALIAN SOCIETY SUGARCANE TECHNOLOGY, 20., 1998, Melbourne. **Proceedings...** Melbourne: ASST, 1998. p. 204-210.

KAHL, G. Molecular biology of wound healing: the conditioning phenomenon. In: KAHL, G.; SCHELL, J. (Ed.). **Molecular biology of plant tumors**. New York: Academic, 1982. p. 211-268.

KASUGA, M. et al. A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible RD29A promoter improved drought-and lowtemperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 346-350, Feb. 2004.

KIZIS, D.; PAGÈS, M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in *rab17* regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. **Plant Journal**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 679-689, Apr. 2002.

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

KUME, S. et al. Differential and coordinated expression of *Cbf* and *Cor/Lea* genes during long-term cold acclimation in two wheat cultivars showing distinct levels of freezing tolerance. **Genes & Genetics System**, Shizuoka, v. 80, n. 2, p. 185-197, 2005.

LAKSHMANAN, P. et al. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 41, n. 2, p. 345-363, Apr. 2005.

LANNEREE, B.; MONIER, V. **Bioethanol in France and Spain**. Paris: T. N. Sofres, 2000. Disponível em:
<<http://www.novem.nl/default.asp?menuId=10&documentId=26450>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 14, p. 4731-4748, Oct. 2011.

LAWLOR, D. W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 695-709, Jan. 2013.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in Plant Science**, The Hague, v. 2, n. 12, p. 470-476, Dec. 1997.

LEUNG, J.; MERLOT, S.; GIRAUDAT, J. The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID INSENSITIVE2 (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2c involved in abscisic acid signal transduction. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 5, p. 759-771, May 1997.

LI, C. Z.; JIAO, J.; WANG, G. X. The important roles of reactive oxygen species in the relationship between ethylene and polyamines in leaves of spring wheat seedlings under root osmotic stress. **Plant Science**, Oxford, v. 166, n. 2, p. 303-315, Feb. 2004.

LIAO, Y. et al. Role of soybean GmbZip132 under abscisic acid and salt stresses. **Journal International of Plant Biology**, Pavia, v. 50, n. 1, p. 221-230, 2008a.

LIAO, Y. et al. Soybean *GmMYB76*, *GmMYB92*, and *GmMYB177* genes confer stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. **Cell Research**, Shanghai, v. 18, n. 10, p. 1047-1060, Oct. 2008b.

LICHT, F. O. **World sugar statistics 2010**. Kent: Agra Informa, 2009. Disponível em:
<http://www.reportlinker.com/report/best/keywords/sugar%20world?utm_source=adwords2&utm_medium=cpc&utm_campaign=Food_ROW&utm_adgroup=Sugar_World_ROW&gclid=CM2cxPP7mboCFS9dQgodkT0AqA>. Acesso em: 10 mar. 2013.

LIM, C. J. et al. Over-expression of the Arabidopsis DRE/CRT-binding transcription factor DREB2C enhances thermotolerance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 362, n. 2, p. 431-436, Oct. 2007.

LIU, L. et al. Molecular cloning, expression profiling and trans-activation property studies of a DREB2-like gene from chrysanthemum (*Dendranthema vestitum*). **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 121, n. 1, p. 215-226, 2008.

LIU, Q. et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low- temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 8, p. 1391-1406, Aug. 1998.

MA, H. et al. Metabolic engineering of invertase activities in different subcellular compartments affects sucrose accumulation in sugarcane cells. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 27, n. 11, p. 1021-1030, Nov. 2000.

MACHADO, P. L. O. de A. **Carbono do solo e a mitigação da mudança climática global**. Salvador: EMBRAPA Solos, 2005. 250 p.

MAHALAKSHMI, A.; KHURANA, P. *Agrobacterium* mediated cereal transformation: a critical appraisal. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 35, n. 2, p. 416-426, 1997.

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

MANSFIELD, T. A.; DAVIES, W. J. Stomata and stomatal mechanisms. In: PALEG, L. G.; ASPINALL, D. (Ed.). **The physiology and biochemistry of drought resistance in plants**. New York: Academic, 1981. p. 315-346.

MARCINSKA, I. et al. Impact of osmotic stress on physiological and biochemical characteristics in drought-susceptible and drought-resistant wheat genotypes. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 35, n. 2, p. 451-461, 2013.

MATSUKURA, S. et al. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 283, n. 1, p. 185-196, 2010.

MATSUOKA, S. et al. **Variedades superpreoces da cana-de-açúcar**. São Carlos: Centro de Ciências Agrárias, 1995. 24 p.

MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Wallingford, v. 45, n. 2, p. 372-381, Apr. 2009.

MATYSIK, J. et al. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. ***Current Science***, Columbus, v. 82, n. 3, p. 525-532, Mar. 2002.

MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. ***Cellular and Molecular Life Sciences***, Basel, v. 54, n. 1, p. 94-103, Jan. 1998a.

MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. ***Current Opinion in Plant Biology***, London, v. 1, n. 2, p. 142-148, 1998b.

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

MILLER, G. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. ***Plant Cell and Environment***, Oxford, v. 33, n. 2, p. 453-467, Feb. 2010.

MIRANDA, J. R. **História da cana-de-açúcar**. Campinas: Komedi, 2008. 167 p.

MOLINARI, H. B. C. **Expressão estresse-induzida do gene P5CS em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico**. 2006. 109 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MOLINARI, H. B. C. et al. Evaluation of the stress inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 130, n. 2, p. 218-229, June 2007.

MONSANTO. **Genuity droughtgard hybrids**. Disponível em: <<http://www.monsanto.com/products/Pages/droughtgard-hybrids.aspx>>. Acesso em: 16 jul. 2013.

MOREA, F. A. O.; JESUS, F. A.; NOGUEIRA, F. T. S. Biotecnologia em cana-de-açúcar. In: CANÇADO, G. M. de A.; LONDE, L. N. (Ed.). **Biotecnologia aplicada à agropecuária**. Caldas: EPAMIG Sul de Minas, 2012. p. 112-124.

NAKASHIMA, K. et al. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. **Plant Journal**, Oxford, v. 51, n. 4, p. 617-630, Aug. 2007.

NEILL, S. J. et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1237-1247, 2002.

OH, S. J. et al. Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 138, n. 2, p. 341-351, Feb. 2005.

OHNISHI, T. et al. OsNAC6, a member of the NAC gene family, is induced by various stresses in rice. **Genes & Genetic Systems**, Shizuoka, v. 80, n. 1, p. 135-139, Mar. 2005.

OZTURK, L.; DEMIR, Y. *In vivo* and *In vitro* protective role of proline. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 38, n. 2, p. 259-264, June 2002.

PELLEGRINESCHI, A. et al. Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. **Genome**, Ottawa, v. 47, n. 3, p. 493-500, Mar. 2004.

POSPÍŠILOVÁ, J. et al. Effect of abscisic acid on photosynthetic parameters during *ex vitro* transfer of micropropagated tobacco plantlets. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 53, n. 1, p. 11-20, Jan. 2009.

QIN, F. et al. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in coldresponsive gene expression in *Zea mays* L. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 45, n. 6, p. 1042-1052, June 2004.

RAUF, M. et al. Performance of wheat genotypes under osmotic stress at germination and early seedling growth stage. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 8, p. 971-975, 2007.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO. **Senso varietal Brasil 2012**. Goiânia, 2012. Disponível em: <<http://www.ridesa.agro.ufg.br/pages/44741>>. Acesso em: 28 jun. 2013.

ROBERT, G. et al. Highly efficient, 5'-sequence-specific transgene silencing in a complex polyploid. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 3, n. 1, p. 88-97, 2010.

RUGGIERO, B. et al. Uncoupling the effects of ABA on plant growth and water relations: analysis of *sto1/nced3*, BA deficient salt stress tolerant mutant in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 136, n. 11, p. 3134-3147, Nov. 2004.

SACIOTO, R. F. Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. 2003. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2003.

SAKUMA, Y. et al. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 49, p. 18822-18827, Dec. 2006.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. Fisiologia das plantas. In: _____. **Fisiologia do estresse**. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 616-643.

SEKI, M. et al. Monitoring the expression patterns of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 1, p. 61-72, Apr. 2001.

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

SHAN, D. P. et al. Cotton GhDREB1 increases plant tolerance to low temperature and is negatively regulated by gibberellic acid. **New Phytologist**, Cambridge, v. 176, n. 1, p. 70-81, Feb. 2007.

SHAO, H. B. et al. Changes of antioxidative enzymes and membrane peroxidation for soil water deficits among 10 wheat genotypes at seedling stage. **Colloids and Surfaces B**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 107-113, Apr. 2005.

SHEN, Y. G. et al. Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte. *Atriplex hortensis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, n. 1, p. 155-161, 2003.

SILVA, R. W. da C.; PAULA, B. L. **Causa do aquecimento global:** antropogênica versus natural. Rio Claro: UNESP, 2009. 49 p.

SOUZA, D. S. L. e et al. Transformação genética de cana-de-açúcar. In: FIGUEIREDO, M. do V. B. et al. (Ed.). **Biotecnologia aplicada à agricultura:** textos de apoio e protocolos experimentais. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica; Recife: Instituto Agrônômico de Pernambuco, 2010. p. 55-66.

SOUZA, E. L. L. de et al. **Etanol e bioeletricidade:** a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética. Brasília: ÚNICA, 2010. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/multimedia/publicacao/>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

STOCKINGER, E. J.; GILMOUR, S. J.; THOMASHOW, M. F. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. **Proceedings National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 94, n. 3, p. 1035-1040, Feb. 1997.

SUPRASANNA, P. et al. Biotechnological developments in sugarcane improvement: an overview. **Sugar Tech**, Melbourne, v. 13, n. 4, p. 322-335, Dec. 2011.

SVAB, Z.; HAJDUKIEWICZ, P.; MALIGA, P. Stable transformation of plasmids in higher plants. **Proceedings National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 87, n. 10, p. 8526-8530, 1990.

SZABADOS, L.; SAVOURE, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 89-97, Jan. 2010.

TORIYAMA, K. et al. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 6, n. 6, p. 1072-1074, 1988.

TRAAS, J. et al. Endoreduplication and development: rule without dividing? **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 1, n. 6, p. 498-503, Dec. 1998.

TRAN, L. S. P. et al. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factor that bind to a drought-responsive *cis*-element in the *early responsive to dehydration stress 1 promoter*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 9, p. 2481-2498, Sept. 2004.

TUTEJA, N. et al. **Omics and plant abiotic stress tolerance**. New Delhi: International Centre for Genetic Engineering & Biotechnology, 2011. 64 p.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Açúcar e álcool: responsabilidade social**. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br/portalunica/files/referencia_publicacoes_institucionais-8-Arquivo.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2012.

VERSLUES, P. E.; ZHU, J. K. Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 33, n. 2, p. 375-379, June 2005.

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

VILARDELL, J. et al. Gene sequence, developmental expression and protein phosphorylation of rab17 in maize. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 423-432, Apr. 1990.

VILARDELL, J. et al. Regulation of the maize *rab17* promoter in transgenic heterologous systems. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 17, n. 5, p. 985-993, Nov. 1991.

WANG, Q. et al. Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 67, n. 6, p. 589-602, Aug. 2008.

WENG, L. X. et al. Transgenic sugarcane plants expressing high levels of modified cry1Ac provide effective control against stem borers in field trials. **Transgenic Research**, London, v. 20, n. 4, p. 759-772, Aug. 2011.

WU, L.; BIRCH, R. G. Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 109-117, Feb. 2007.

XIONG, Y.; FEI, S. Z. Functional and phylogenetic analysis of a DREB/CBF-like gene in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Planta**, Berlin, v. 224, n. 4, p. 878-888, Sept. 2006.

XU, Z. S. et al. Isolation and functional characterization of HvDREB1: a gene encoding a dehydration-responsive element binding protein in *Hordeum vulgare*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 122, n. 1, p. 121-130, Jan. 2009.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 1, p. 251-264, 1994.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant response to drought, acclimation, and stress tolerance. **Photosynthetica**, Prague, v. 38, n. 2, p. 171-186, Nov. 2000.

ZARKA, D. G. et al. Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a cold regulatory circuit that is desensitized by low temperature. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 2, p. 910-918, 2003.

ZHANG, S. Z. et al. Expression of the *Grifola frondosa* trehalose synthase gene and improvement of drought-tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 48, n. 4, p. 453-459, Apr. 2006.

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

ZHU, J. K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 4, n. 5, p. 401-406, Oct. 2001.

ZHU, Y. J. et al. Genetic transformation with untranslatable coat protein gene of sugarcane yellow leaf virus reduces virus titers in sugarcane. **Transgenic Research**, London, v. 20, n. 3, p. 503-512, June 2011.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1 Induced over-expression of *atdreb2a ca* improves drought tolerance in sugarcane

Artigo normalizado de acordo com o periódico 'Plant Biotechnology Journal'.

**INDUCED OVER-EXPRESSION OF *ATDREB2A* CA IMPROVES DROUGHT
TOLERANCE IN SUGARCANE**

Rafaela Ribeiro Reis^{1,2#}, Bárbara Andrade Dias Brito da Cunha^{1#}, Polyana Kelly Martins¹, Maria Thereza Bazzo Martins¹, Jean Carlos Alekcevetch², Antônio Chalfun Júnior², Alan Carvalho Andrade³, Ana Paula Ribeiro^{1,2}, Feng Qin^{4}, Junya Mizoi⁵, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki⁵, Kazuo Nakashima⁴, Josirley de Fátima Corrêa Carvalho⁶, Carlos Antônio Ferreira de Sousa¹, Alexandre Lima Nepomuceno⁶, Adilson Kenji Kobayashi¹, Hugo Bruno Correa Molinari^{1*}**

¹Genetics and Biotechnology Laboratory, Embrapa Agroenergy (CNPAAE), Brasília, DF, Brazil

²Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brazil;

³Molecular Genetics Laboratory, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology (CENARGEN), Brasília, DF, Brazil

⁴Biological Resources and Post-harvest Division, Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), Tsukuba, Japan

⁵Laboratory of Plant Molecular Physiology, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

⁶Plant Biotechnology Laboratory, Embrapa Soybean, Londrina, PR, Brazil

*Correspondence (Tel +55-61 3448 2307; Fax +55-61 3448 1589; e-mail: hugo.molinari@embrapa.br)

#R.R.R and B.A.D.B.C. contributed equally to this work.

**Present address: Key Laboratory of Plant Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

Resumo

A cana-de-açúcar é uma cultura importante em todo o mundo, não só para a produção de açúcar e etanol, mas também como uma fonte de biomassa lignocelulósica para etanol de 2^a geração e produção de energia. A seca é uma das questões agrícolas mais difíceis e que limita a produtividade da cultura, em alguns casos, as perdas causadas pela seca podem chegar a quase 50%. As Dehydration-Responsive Element-Binding proteins (DREBs) desempenham funções reguladoras importantes em resposta ao estresse abiótico em plantas. O fator de transcrição DREB2A interage com um elemento *cis*-acting Dehydration-Responsive Element (DRE), para ativar a expressão de genes que estão envolvidos na resposta à diversos estresses, como a seca, sal e calor em *Arabidopsis thaliana*. No presente estudo, avaliamos os efeitos da expressão estresse-induzida do gene *AtDREB2A CA*, no potencial de água na folha (Ψ_L), conteúdo relativo de água (RWC) e nas trocas gasosas nas plantas de cana-de-açúcar cultivadas em sistema Rhizotron. As plantas também foram fenotipadas analisando as raízes e medindo os parâmetros morfológicos da parte aérea. A expressão estresse-induzida do *AtDREB2A CA* nas canas-de-açúcar transgênicas levou ao aumento da regulação de genes envolvidos na proteção celular contra a desidratação. As plantas transgênicas mantiveram maior RWC ao longo de 4 dias após a suspensão da irrigação e apresentaram taxas fotossintéticas mais altas até o 3^o dia sem água. No entanto, as diferenças de massa seca entre plantas transgênicas e não-transgênicas não foram estatisticamente significativas. A expressão estresse-induzida do *AtDREB2A CA* levou a um aumento dos níveis de sacarose e maior brotação das gemas das plantas transgênicas. Os nossos resultados indicam que a expressão estresse-induzida de *AtDREB2A CA* na cana-de-açúcar aumentam a sua tolerância à seca, sem penalizar o rendimento.

Palavras-chave : Estresse abiótico; *AtDREB2A CA*; promotor *ZmRab17*; *Saccharum* spp; fator de transcrição

Summary

Sugarcane is an important crop worldwide not only for sugar and ethanol production, but also as a lignocellulosic biomass source for 2nd generation ethanol and electricity production. Drought is one of the most challenging agricultural issues limiting sustainable sugarcane production and, in some cases, yield losses caused by drought are nearly 50%. Dehydration-responsive element-binding proteins (DREBs) play vital regulatory roles in abiotic stress responses in plants. The transcription factor DREB2A interacts with a *cis*-acting dehydration-responsive element (DRE) sequence to activate the expression of downstream genes that are involved in drought-, salt- and heat-stress response in *Arabidopsis thaliana*. In the present study, we evaluated the effects of the stress-inducible over-expression of *AtDREB2A CA* in the gene expression, leaf water potential (Ψ_L), relative water content (RWC) and gas exchanges of sugarcane in a rhizotron-grown root system. The plants were also phenotyped by scanning the roots and measuring morphological parameters of the aerial part. The stress-inducible expression of *AtDREB2A CA* in transgenic sugarcane led to the up-regulation of genes involved in cell protection against dehydration. The transgenic plants maintained higher RWC and Ψ_L over 4 days after withholding water and had higher photosynthetic rates until the 3rd day of water-

deficit. However, differences in plant dry matter between transgenic and non-transgenic plants were not statistically significant. Induced expression of *AtDREB2A CA* in sugarcane increased sucrose levels and improved bud sprouting of the transgenic plants. Our results indicate that induced expression of *AtDREB2A CA* in sugarcane enhanced its drought tolerance without yield penalty.

Keywords: abiotic stress; *AtDREB2A CA*; *ZmRab17* promoter; *Saccharum* spp.; transcription factor

Introduction

The importance of sugarcane cultivation has increased in recent years due to ethanol production, which is considered as one of the most viable alternative to fossil fuels (Savage, 2011). Production of biofuels are important not only for oil import reduction but also to ameliorate CO₂ emissions generated by burning fossil fuels as gas emissions contributes to global warming and climate changes (Crago et al., 2010; Rogelj, 2013).

Brazil is the world's leader in sugarcane ethanol production and, in addition to this, the crop has an important social role in the Brazilian agribusiness, improving opportunities for farmers and rural communities. According to UNICA (Sugarcane Industry Union - Brazil), the sugar-ethanol sector creates 1.2 million direct rural jobs, which account for 70 thousand producers in 2011/2012 milling season (UNICA, 2013).

According to the Brazilian sugarcane agroecological zoning, the Cerrado's degraded pasture land was mapped as a promising area for expanding sugarcane production (Embrapa, 2009). However, the irregular rainfall in the Cerrado usually leads to severe drought stress which affects the crop growth (Assad, 1994). According to Sugiharto (2004) drought is the main factor that influences sugarcane productivity as it directly affects tillering and culm height, resulting in decreased sucrose production.

Currently, the development of genotypes tolerant to drought stress is one of the main objectives of sugarcane research programs; however, the achievement of such goal is hampered by the high-ploidy level of the modern sugarcane varieties and by the fact that drought tolerance is a multigenic as well as a quantitative trait. Besides, plant responses to drought are influenced by the time, intensity, duration, and frequency of the stress as well as by diverse plant-soil-atmosphere interactions (Bhatnagar-Mathur et al., 2007; Claeys and Inzé, 2013).

The use of biotechnology in public and private breeding programs allowed the development of events with improved traits, such as higher sugar content (Wu and Birch, 2010; van der Merwe, 2010), higher resistance to diseases and pests (Arvinth, 2010; Weng et al., 2011; Zhu et al., 2011), better tillering and deeper roots (Gaxiola, Edwards and Elser, 2011), increased tolerance to drought, heat and low-temperature (Belintani et al., 2012; Molinari et al., 2007; Zhang et al., 2006), and desired agronomical and industrial qualities (Harrison et al., 2011; Basnayake et al., 2012). In addition, the introduction of some specific genes allowed the understanding of molecular, cellular and physiological mechanisms of plant responses to environmental stresses (Gollack, Lüking and Yang, 2011). One alternative approach to the development of drought tolerant plants is to genetically engineer plants to introduce stress-tolerant genes, including genes for transcription factors (TFs). TFs recognize specific DNA sequences in the regulatory regions of target genes and lead to the activation of downstream genes responsive to abiotic stresses. One relevant class of transcription factors is the dehydration-responsive element-binding proteins - DREBs (Lata and Prasad, 2011).

The dehydration-responsive element (DRE), which has a core sequence of A/GCCGAC, is a *cis*-acting element originally isolated from the promoter of the *Rd29a* gene of *Arabidopsis thaliana* and is involved in both cold- and dehydration-inducible gene expression by an abscisic acid (ABA)-independent pathway (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994). DRE-binding protein 2A (DREB2A) is a transcriptional activator that recognizes DRE in *Arabidopsis*. It is a member of the DREB subfamily within the APETALA2/ethylene responsive-element binding factor (AP2/ERF) family of TFs and contains a single conserved DNA-binding domain (Sakuma et al., 2002). Its expression is induced by dehydration, high salinity and heat shock (Sakuma et al., 2006). The transcription of *DREB2A* in response to dehydration and heat shock is independently regulated by different regions in the *DREB2A* promoter (Yoshida et al., 2011). The inducible response to stress conditions is a common feature among DREB2-type transcription factors of various plants, and the promoter structure including these *cis*-elements is conserved among many eudicot species (Mizoi et al., 2012).

The over-expression of *DREB2A* gene in *Arabidopsis* (Sakuma et al 2006) and several other transgenic plants such as maize (Qin et al. 2007), rice (Bihani et al. 2011), tobacco (Chen et al. 2008) and wheat and barley (Morran et al., 2011) resulted in improved stress tolerance. Because accumulation of *DREB2A* mRNA is not sometimes sufficient for the induction of downstream genes due to posttranslational regulation, Sakuma et al. (2006) obtained the constitutively active form of the *AtDREB2A* gene (*AtDREB2A CA*) through the removal of a negative regulatory domain downstream of the DNA-binding domain.

In our study, it was demonstrated that transgenic plants of sugarcane containing the *AtDREB2A CA* gene under the control of the stress-inducible promoter *Rab17* had improved drought tolerance and higher sucrose content with no yield penalty.

Results

Plant transformation

Embryogenic calli of sugarcane RB855156 were transformed with *Rab17:DREB2A CA* construct and the putative transgenic calli were selected with 3 mg l⁻¹ glufosinate ammonium selective medium (Figure S1). DNA from putative transgenic plantlets was extracted and amplified by PCR using primers designed from the *AtDREB2A CA* gene. The 674-bp amplification product corresponding to the promoter *Rab17* and *DREB2A CA* region was present in all transgenic sugarcane lines. From 723 explants inoculated, 24 plantlets longer than 5 cm were recovered and all of these plantlets were PCR positive, giving a transformation efficiency of 3.3%. To complement the PCR data, a *bar/PAT* detection strip test was used to check the presence of the protein (data not shown). Herbicide leaf painting and spraying assays were performed in order to select transgenic plants with high tolerance to this herbicide. Individual transformants exhibited tolerance to glufosinate ammonium 1% (v/v) and remaining unaffected, but the escapes showed yellowing and apparent necrosis 8 days after application (Figure S2).

All twenty four transgenic events were submitted to water deficit treatments in 8L pots for 6 days. Fifteen non-transgenic plants were used as controls. Eight independent events were selected as drought tolerant considering reduced leaf rolling and senescence and were selected for Southern blot analysis, based on their improved performance on preliminary drought experiments (Figure 1). Among the eight drought tolerant events se-

lected, event 24.2 was selected as the most drought tolerant. Another water deficit experiment was conducted using three clones from event 24.2 to confirm its drought tolerance in comparison to non-transgenic plants. Plants were placed in 8L pots and after growing for 30 days, water was withheld for 21 days. Again, event 24.2 presented the best performance under water deficit and then was selected for further analysis. Genomic DNA isolated from each event was digested with *Bcl*II, an enzyme that release the 1.75-kb *Rab17::DREB2A CA::TNos* cassette out of the vector. The presence of the 1.75-kb band was detected in all eight events (Figure 2) showing that at least one intact *AtDREB2A CA* sequence was present. As there is only one *Ssp*I site in the cassette, the number of hybridizing bands indicates the number of integration sites in the nuclear genome of transgenic sugarcane plants (data not shown). These analyses showed that the eight analyzed lines were independent transgenic events. The number of copies of the transgene varied from a 1-2 (B5.P5, B9.P2 and B9.P3) to over 15 copies (3/2). The 24.2 event presented 3 copies of the transgene inserted in the genome (Figure 2).

Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

The relative abundances of transcripts of *AtDREB2A CA* and of other six sugarcane genes known to be induced by drought were evaluated in transgenic (T) and non-transgenic (NT) plants. Transcripts expression levels were standardized to transcripts of *GAPDH* and *25S rRNA* as reference genes as these genes are known to be expressed at a relatively constant level in sugarcane leaves (Iskandar et al., 2004).

RT-qPCR analysis of the *AtDREB2A CA* gene under the control of *Rab17* promoter were performed using leaf samples collected in well-watered and 2, 3 and 4 days after with-

holding water, which correspond to -0.6, -1.5, -1.7 and -1.9 MPa, respectively. This analysis revealed a basal level activity of the *Rab17* promoter in the leaves of the transgenic plants in the absence of water deficit (Figure 3a). However, drought stress quickly activated the *Rab17* promoter leading to a strong *AtDREB2A CA* expression in transgenic plants (Figure 3a).

Differential expression of transcripts encoding proteins related to proline and raffinose metabolism, late embryogenesis abundant (LEA) and dehydrins and also two *Saccharum* drought responsive genes (SCDRs) were observed between plants at well-watered conditions and under different levels of drought stress. Even the basal activity of *Rab17* was able to up-regulate the expression of three (*GOLS*; *SCDR2* and *SCDR4*) out of six stress-inducible genes analyzed in the absence of water deficit stress (Figure 3b, c and d). Also, all six genes tested were up-regulated after the 2nd and 3rd day of drought stress, decreasing on the 4th day (Figure 3b, c, d, f and g).

Plant water status and gas exchange

In order to determine the responses of the transgenic (T) and non-transgenic (NT) plants to drought stress, a greenhouse experiment was carried out using PVC cylinders filled with equal amount of substrate. The plants were well-watered until the E-5 phase (Nakano, 2011) and then water was withheld. Three days before withholding the water, the leaf water potential, relative water content and gas exchange rates of each plant were monitored to assure that the water status of T and NT plants were similar at this condition. It was found that the differences in the leaf water potential (Ψ_L), relative water content (RWC), net photosynthesis rate (*A*), concentrations of CO₂ in the substomatic

chamber (C_i), transpiration (E) and stomatal conductance (g_s) between both plant types were not statistically significant under well-watered conditions (Figure 4).

Under water deficit, the Ψ_L and RWC in T and NT plants were similar until day 3 with mean values of -1.41 MPa and 74%, respectively. On the 4th day after withholding water the Ψ_L and RWC of the NT dropped to nearly -2 MPa and 60%, respectively whereas the Ψ_L and RWC of the T increased to -1.42 MPa and 75%. Despite the changes in the water status of both plant materials, decreases in the gas exchange rates were similar for T and NT plants over the water deficit period except for day 2 and day 3 (Figure 4). The gas exchange rates (A , g_s and E) of the T plants were higher than NT. However, statistical significance was only found for A and g_s at day 2 and 3 after withholding water (Figure 4). At the 4th day after withholding water the stomatal conductance was below $0.1 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and photosynthesis was close to zero for both plant materials. At this point, the NT plants appeared completely wilted and exhibited leaf rolling while T leaves were still turgid and expanded (data not shown).

Therefore, differential responses to the drought stress of T and NT plants were observed only on the 2nd and 3rd day within the water deficit period when the stomatal conductance and photosynthesis of the NT plants decreased at higher rates than the T plants. Atmospheric conditions at day 2 were characterized by a water vapor deficit (VPD) of 3kPa, temperature of 30°C and 30% of relative humidity (Figure S3). As VPD of day 3 was also 3kPa we analyzed differences on the air temperature and relative humidity between these two days. It was found that relative humidity and temperature occurring on day 3 were 47% and 35°C respectively. Therefore it was concluded that differences between T and NT were more evident under atmospheric conditions similar to day 2

which together with the lowering of the substrate humidity produced a moderate level of stress (RWC =80% and water potential ~ -1.5 MPa for the NT and T plants) in the plants. According to the Hsiao (1973) criteria, plants on day 3 were experiencing a severer stress (RWC =70% and water potential lower than -1.5 MPa for the NT plants).

Plant biomass determination, yield indexes, sucrose content and sprouting rate

Clones of transgenic sugarcane plants from the event (24.2) as well as the non-transgenic control plants were subjected to water-deficit for 4 days. At the end of the stress period, we found no significant differences on the shoot (leaves plus culms) and root dry weights (Figure 5a and b). Statistical differences were found, however, for some yield indexes such as culm linear length and internode length (Figure 5c and d), which were higher for the T plants. The number of internodes and culm diameter of both plant types were similar and not statistically significant (data not shown). Scan analyses of the root system of T and NT plants did not show significant differences in the major parameters analyzed (diameter, volume and root length). Despite not statistically different, the root surface area of NT plants was higher than for T plants due to the presence of more roots larger than 0.9 mm (Figure S4).

At the end of experiment, the sucrose content in the culms of plants was 33.8% higher than in the non-transgenic plants (Figure 5e), suggesting that T plants were capable of anticipating its maturation stage.

One of the most important characteristics of sugarcane varieties is their capacity of initial sprouting. The cv. RB855156 used in the present study has high yields and sucrose levels; however, low initial sprouting is a major concern for this variety (Silva, Carlin

and Perecin, 2004). It was observed that the RB855156 transformation with the *Rab17::DREB2A CA* construct significantly improved bud sprouting in the transgenic plants (82%) compared with non-transgenic plants (61%) (Figure 5f).

Discussion

The use of *DREB2* gene to confer abiotic stress tolerance was demonstrated in several model plants and also in commercially important C3 plants (Bihani et al. 2011; Chen et al. 2008; Morran et al., 2011). *ZmDREB2* was reported to express and function in C4 plant maize (Qin et al. 2007; Liu et al. 2013). However, no *DREB2A* factor has been over-expressed in sugarcane. In order to further investigate the potential use of this gene in a C4 monocot species, the *AtDREB2A CA* gene was inserted in sugarcane under the control of drought inducible *Rab17* of maize.

The presence and expression of the transgene under drought conditions has been confirmed in T0 plants for several independent events (Figure 2 and 3). The phenotype of the transgenic plants was analyzed using the event 24.2, which was chosen based on a preliminary survival test under drought conditions (Figure 1).

Stress-induced expression of the *AtDREB2A CA* gene in sugarcane had no negative effects on the plants morphology and growth; instead, it increased the culm linear length and internode length of eight months-old plants that were submitted to water deficit for 4 days (Figure 5c and d). Therefore, the use of the stress inducible promoter *Rab17*, a well-characterized ABA-responsive gene from maize, overcame the difficulties encountered when using constitutive promoters, which is frequently associated with plant

growth retardation (Kasuga et al., 1999; Kasuga et al., 2004, Kim et al., 2004 and Morran et al., 2010).

The promoter *Rab17* has ABA responsive elements (ABRE) in a 100 bp segment of the promoter (Vilardell et al., 1991) and also several *cis*-elements (five putative ABREs and four other motifs) important for strong activity in response to abiotic stresses (Busk et al., 1997). Among these elements there is a GC-rich rab Activator element, CAC-TGGCCGCCC, responsible for the low constitutive expression of *Rab17* in maize leaves, and drought responsive elements (DREs) (Busk et al., 1997). Activation of the *Rab17* promoter is induced by ABA, drought and salt stress through the single DRE, named DRE2 (Busk et al., 1997). Kizis and Pages (2002) suggested that the *Rab17* promoter could be suitable for drought-inducible expression of DREB transcription factors.

The gas exchange rates (*A*, *g_s* and *E*) of the T plants were higher than NT. However, statistical significance was only found for *A* and *g_s* at day 2 and 3 after withholding water (Figure 3). *Ci* analysis showed that CO₂ accumulated as the water stress developed and it was higher for NT plants at day 2. This accumulation of carbon dioxide indicates a limitation on CO₂ assimilation processes rather than a higher stomatal conductance to CO₂ as NT plants had lower values of *g_s* in this condition. It is possible that water-deficit stress may have induced damage in photosynthesis or early senescence in the NT compared to the transgenic plants and this caused decreased Rubisco amount and activity (Olsson 1995; Jiang et al. 1993).

Water potential and RWC measurements revealed that the level of stress of the T and NT plants did not differ after two days of water withholding (Figure 4). In this case, the attained values of -1.5 MPa (WP) and 85% (RWC) represent a moderate stress condition

(Hsiao, 1973). It is noteworthy that this level of stress was kept until the end of the experimental period for the T plants, while for the NT a more severe water stress developed.

According to Lawlor (2013) the development of symptoms of water-deficit in transgenic plants decreased A and increased non-photochemical chlorophyll a fluorescence for instance (Wang et al., 2008; Woo et al., 2008) is delayed when compared to non-transgenic plants as a consequence of water saving mechanisms of the transgenic plants caused by its lower transpiration rates. He reports that higher transpiration rates of transgenic plants dries the soil faster than the transgenic plants and decreases non-transgenic leaf water potential, RWC, and g_s more rapidly. As a consequence, metabolism of the transgenic plants is not affected when that of the non-transgenic is greatly impaired. Photosynthesis of the transgenic plants may continue over the period when the wild type is stressed, resulting in larger transgenic than non-transgenic plants after a period. While the small decreases in leaf area and/or g_s in our transgenic sugarcane plants may accumulate over several days, resulting in much smaller total water loss, as explained by Lawlor (2013) in the paragraph above, from the data obtained in our studies it seems that the improved drought response of the T plants was not associated with altered transpiration rates mediated by stomatal closure or reduced leaf area.

Plants characteristics determining total water loss are: leaf area (LA) and g_s (Lawlor, 2013), mesophyll resistance, number of stomata / unit area and stomata structure (Holmstrom et al., 1996; Goddijn et al., 1997; Fernandez-Aunion et al., 2010) and cell-to-cell water permeability mediated by an abundance on PIP aquaporins (Yooyongwech

et al., 2013). Therefore, these parameters should be evaluated in further studies with the *Rab17::DREB2A CA* transgenic plants.

The functional genes evaluated in this study showed specific modulation to each stress level, suggesting that the transgenic plants were more capable to sense the degree of water stress and to activate different response pathways to cope with that stress compared with non-transgenic plants. Therefore, the stress-inducible production of *AtDREB2A CA* was sufficient to regulate the expression of different classes of genes related to the protection of the cell against dehydration.

Previous microarray studies in transgenic *A. thaliana* plants carrying the *35S:AtDREB2A CA* cassette showed over-expression of genes as *LEAs*, galactinol synthase, dehydrins and genes of hydrophilic proteins associated with membranes (Sakuma et al., 2006). *LEA* genes (CA094376), known to be responsible for protecting macromolecules such as enzymes and lipids from dehydration (Shinozaki e Yamaguchi Shinozaki, 1999; Sakuma et al., 2006), were strongly up-regulated in the leaves of our transgenic sugarcane two days after suspending the irrigation, whereas in the non-transgenic plants up regulation was only observed four days after suspending the irrigation. Dehydrins were up regulated on the 2nd and 3rd days. The precise function of dehydrins has not been established yet, but in vitro experiments revealed that some dehydrins (YSK(n)-type) bind to lipid vesicles that contain acidic phospholipids, while others (K(n)S-type) were shown to bind metals and have the ability to scavenge hydroxyl radicals (Asghar et al., 1994), protect lipid membranes against peroxidation or display cryoprotective activity towards freezing-sensitive enzymes (Rorat, 2006). Similarly to the transcripts of dehydrins, transcripts of *SCDR2* and 4 were up-regulated on the 2nd and 3rd days, respectively. Although func-

tions of *SCDR2* and *SCDR4* are yet unknown *SCDR2* has been reported to be related to drought and salt stress tolerance (Nogueira et al., 2012).

Proline is a well-known compatible solute as well as an antioxidant and osmoprotectant (Hayat et al., 2012). Our results showed that the transgenic plants were capable of up-regulating the *P5CS* transcripts abundance which suggests the participation of this functional amino acid in the enhanced tolerance of the *Rab17::DREB2A CA* plants. Molinari et al. (2007) working with transgenic sugarcane plants over-expressing P5CS (Δ 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase) for proline synthesis showed that this amino acid protected the plants against the oxidative stress caused by water deficit. We also examined the transcripts of galactinol synthase (*GOLS*), enzyme that plays a key role in the accumulation of galactinol and raffinose under abiotic stress conditions. According to Taji et al. (2002), galactinol and raffinose may function as osmoprotectants in drought-stressed plants. Our results showed that changes in *GOLS* transcripts abundance were already noted before suspending the irrigation and increased with the development of the water deficit, reaching its peak of expression three days after withholding water.

Several studies reports that the over-expression of *DREB* genes driven by the *CaMV 35S* or the *rd29A* promoter led to the accumulation of stress-inducible downstream genes coding for LEAs, dehydrins and heat-shock-related proteins, hence providing plants with enhanced stress tolerance (Oh et al., 2005; Sakuma et al., 2006; Schramm et al., 2008). Furthermore, elevated contents of osmoprotectants such as free proline, the soluble sugars sucrose and raffinose and other metabolites like galactinol and myo-inositol have also been detected in such transgenics (Gilmour et al., 2000; Ito et al., 2006; Muruyama et al., 2009). Therefore analysis of these metabolites would provide more insights in the

mechanisms used by the *Rab17::DREB2A CA* transgenic sugarcane plants to cope with the drought stress. From the data obtained here, it seems that the improved drought response of the transgenic sugarcane plants was not associated with altered transpiration rates mediated by stomatal closure or reduced leaf area. Instead, it appears to be a consequence of the induced expression of genes related to cell protection against dehydration. The enhanced drought tolerance showed by the *Rab17::DREB2A CA* plants resulted in improved initial bud sprouting, increased culm linear and internode lengths and higher sucrose content (33.8%). In this case, it is well documented that accumulation of soluble sugars is strongly correlated with the acquisition of drought tolerance in plants (Hoekstra and Buitink, 2001, Kameli and Losel, 1993; Al Hakimi, Monneveux and Galiba, 1995; Cui et al., 2011).

In conclusion, our results show that transformation of sugarcane with the *AtDREB2A CA* gene under the control of the *Rab17* promoter enhanced the tolerance of the sugarcane variety RB855156 to water deficit. Moreover, as a consequence of the increased tolerance, the transformed plants had greater culm linear length and internode length and higher sucrose content when grown at well watered conditions after previous exposure to water deficit. As the success of any biotechnological strategy would ultimately be determined by the final yield at field conditions the next studies will involve the analysis of the performance of the multiple sugarcane transgenic events including event 24.2 used in this study at realistic field conditions and under different water regimes.

Experimental procedures

Tissue culture and plant transformation

Leaf segments of 6-8-month-old plants of the sugarcane variety RB855156 were surface sterilized with 2.5% (v/v) sodium hypochlorite solution, and the outer leaves were aseptically removed. Transverse segments 2-3 mm wide were excised above the apical meristem and placed on solid MS medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 20 g L⁻¹ sucrose and 3 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and solidified with 8 g L⁻¹ Bacto Agar. Embryogenic calli were selected and cultured at 3-week intervals on the same medium prior to bombardment (Bower et al. 1996). The microprojectile suspension was prepared as described by Sanford et al. (1993).

The expression vector used for transformation of sugarcane (pBract 302) contains the *A. thaliana* DREB2A (*AtDREB2A*) CA (Sakuma et al., 2006) coding sequence driven by a stress-inducible promoter Rab17 from maize (*Zea mays*) (Busk et al., 1997). *Hind*III-Rab17 promoter-*Sma*I fragment was inserted through *Hind*III and *Eco*RV sites of pBract302. Then *Pst*I-*AtDREB2A* CA:NosT-*Eco*RI fragment was blunted and inserted through *Sma*I site. The pBract 302 also contains the bar cassette used as selective marker.

Following bombardment, calli were transferred to MS medium for 10 days without plant growth regulators and then placed on MSC3 (Bower et al. 1996) with 3 mg L⁻¹ glufosinate ammonium. Resistant calli were placed on 2,4-D-free MS medium for regeneration under 27 ± 1°C with a 16-h photoperiod (30 µmol m⁻² s⁻¹). The rooted plantlets were transferred to planting trays containing a commercial propagation substrate (PlantmaxTM) and grown in a controlled greenhouse conditions.

Molecular analyses and selection of events

Standard polymerase chain reaction (PCR) techniques were used to detect the presence of the *AtDREB2A CA* transgene in leaf samples from regenerated putative transgenic sugarcane plantlets. The *Rab17::DREB2A CA*-specific primer sequences 5' - TGTTATGCAGTTCGCTCTGG - 3' and 5' - CTACATCGGCTATTCTCTGG - 3' were used to give a 674-bp product. Plants that presented amplification of the expected size product and non-transgenic plants were sprayed with 1% (v/v) glufosinate ammonium and evaluated 8 days after spraying.

Southern blot analyses were performed to confirm the integration of the *AtDREB2A CA* gene in transgenic plants. DNA samples (20 µg) were digested overnight with *BclI*, electrophoresed on 1% (w/v) agarose gel, transferred onto nylon membranes (Hybond-N⁺, GE Healthcare, Piscataway, NJ) and fixed through incubation of 2 h at 80°C. A 1.75-kb sequence corresponding to *Rab17::DREB2A CA::TNos* was used as probe. Labeling was performed using [α -³²P]dCTP by random primer labeling. Hybridization and washings were performed at 42°C. Membranes were exposed with BAS-MS 2340 IP support, and the data was acquired using a Fluorescent Image Analyzer FLA-3000 (Fujifilm Life Science).

Real-time RT-PCR assays

To eliminate contaminant genomic DNA, samples were treated with RQ1 RNase-free DNase according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA), and RNA quality was verified by agarose gel electrophoresis and visual inspection of the ribosomal RNA bands upon ethidium bromide staining. Synthesis of first strand cDNA

was accomplished by treating 1 µg of total RNA with the SuperScript III using a One-Step RT-PCR system (Invitrogen, Carlsbad, CA) and oligo (dT15) according to the manufacturer's recommendations. The qPCR was carried out with synthesized single-stranded cDNA as described above and using the protocol recommended for the use with Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). The qPCR was performed with 1 µl of diluted ss-cDNA and 0.4 µM glyceraldehyde-6-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), 0.2 µM for 25S ribosomal RNA (*25S rRNA*) and 1 µM for *DREB2A*, galactinol synthase (*GOLS*), *Saccharum* drought responsive 2 (*SCDR2*), *Saccharum* drought responsive 4 (*SCDR4*), delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*), late embryonic abundant (*LEA*) and dehydrin (*DHY*) of each primer in a final volume of 10 µl with 1 × SYBR green fluorochrome (SYBR Green qPCR Mix-UDG/ROX, Invitrogen). All samples were amplified in triplicate assays using the following conditions: 50°C for 2 min and 95°C for 10 min for 1 cycle, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 59°C for 1 min. The dissociation stage was performed at 95°C for 2 min, followed by 60°C for 15 s and then at 95°C for another 15 s. The specificity of the PCR products generated for each set of primers was verified by analyzing the T_m of amplified products. Relative gene expression levels were calculated using the Q-Gene software (Muller et al., 2002) featuring an efficiency corrected threshold cycle based algorithm. *GAPDH* and *25S rRNA* (Iskandar et al., 2004) were used as housekeeping genes and the geometrical mean of the relative quantities (RQs) was calculated using BestKeeper software (Pfaffl et al., 2004). Individual amplification efficiencies were established with LinRegPCR v.2013.0 using a window-of-linearity. Primers and average efficiency of the primer pairs are listed in Table 1.

Water-deficit assays

Out of eight independently selected transformation events, the event 24.2 was selected for a preliminary drought experiment when the plants were submitted to 21 days of water-deficit stress (Figure 1). Six cloned plants with similar size of the selected transgenic event 24.2 and non-transformed control were grown in 60-L PVC cylinders (see details below - *Rhizotron trials*). The PVC cylinders were placed in similar positions in relation to incidence of solar radiation, and the 8-months-old plants were submitted to a 4-day water-deficit stress period.

Rhizotron trials

To minimize the variability among individuals, plantlets of transgenic event 24.2 with similar age and size were selected. The sugarcane plants were grown in PVC cylinders (25 cm diameter, 150 cm height). The trials were carried out in a randomized block design (RBD) with five replications for both transgenic and non-transgenic plants. The PVC cylinders were assembled in clusters of six in a wooden rack designed according to Kashiwagi et al. (2005). Each PVC cylinder was lined with a plastic bag and filled with 56 kg of red-yellow Latosol/sand/vermiculite mixture (5:4:1, w/w/w) maintained to field capacity (FC) until plants reached 8 months-old. The leaf water potential (Ψ_L) was measured in all plants in order to standardize water status in the beginning of experiment and also monitor the water status during water deprivation.

Plant water status

The water tension in the xylem was measured daily (8:00 to 11:00), using a Scholander pressure chamber (Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA) on the +4 leaf, a fully expanded photosynthetically active leaf. These measurements were assumed to represent the leaf water potential (Ψ_L). Leaf relative water content (RWC) was estimated according to Silva et al. (2007). Squares of 2 cm² of +5 leaf (base, middle, top) was weighed in a precision balance (Marte - AL200C) to determine fresh weight, and placed in distilled water at room temperature for 48 h in darkness; thereafter, turgid weight was recorded. Finally, the samples were dried in an oven at 65°C for 48 h and dry weights were recorded. RWC was calculated as: $RWC (\%) = [(FM - DM) / (TM - DM)] * 100$ according to Matin et al. (1989).

Gas exchange measurements

Net photosynthetic rate (A), intercellular CO₂ concentration (C_i), stomatal conductance (g_s) and transpiration (E) were assessed using an open gas exchange system with a 6 cm² clamp-on leaf cuvette (LI-6400XT, LICOR, Lincoln, NE, USA). Leaf gas exchange was evaluated in the middle third of the second fully expanded leaf with visible ligule (+2 leaf) (van Dillewijn, 1952). These measurements were taken every day between 8:00 and 11:00, during the 4 days of water withholding. Photosynthetic photon flux density (PPFD) was fixed at 1.500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, using a red-blue LED light source built into the leaf cuvette, though other environmental factors, such as air humidity and temperature, were not controlled, i.e. natural variation was permitted. The vapor pressure deficit in the cuvette was maintained below 2.5 kPa to prevent stomatal closure due to the low air

humidity effect. The air collected outside the greenhouse was passed through a buffering zone and then pumped into the system, with mean CO₂ concentration of 380 μmol mol⁻¹.

Biomass determination and yield indexes

After 4 days without watering, the plants were removed from the PVC cylinders and divided into stems plus leaves and roots (carefully washed). Biomass yield was recorded and averaged in fresh weight and after the dry basis when the samples were vented drier (80°C) until reaching constant weight in analytical balance (Marte - model AL200C). Yield indexes such as culm length and diameter, number and length of internodes were also measured using a digital paquimeter (Vonder - model PPV-1506).

Sucrose content

At the end of experiment, aliquots of cane juice from the last, penultimate and antepenultimate internodes were collected and stored at -20°C for sucrose content determination. The compounds of the juice were separated by high-performance liquid chromatography (HPLC) and subsequently quantified using refractive index detection (RID). HPLC-RID was conducted with an Agilent 1260 Infinity system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with an Aminex HPX-87H anion-exchange column, 300 by 7.8 mm (Bio-Rad, Hercules, CA). Samples were diluted with 9 volumes of H₂O, injected into the HPLC-RID system (50-μl injection volume), and eluted isocratically with 0.02 N H₂SO₄ at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹ (RID flow cell, 45°C; column, 50°C). Reference compound (Fisher Scientific) was diluted in H₂O and used to generate a standard curve.

Roots growth measurements

Roots were carefully washed and dipped in 50% (v/v) ethanol solution. Then, it was scanned at a resolution of 200 dpi, borderless 10 classes with 0.1 mm length range (Epson Expression 10000XL scanner), and the background noise was removed from images using Adobe Photoshop version 5.0 LE (Adobe Systems). Root growth such as diameter, volume, surface area and root length was determined by analyzing scanned images by WinRHIZO version Pro2007a (Regents Instruments).

Statistical analysis

Experimental data were analyzed using randomized block design (RBD) with five replications for each treatment (non-transgenic plants and transgenic event 24.2). Samples for all analysis were collected at days 0, 1, 2, 3 and 4 after withholding water. Differences among treatments were analyzed by one-way ANOVA, taking $P < 0.05$ as significant according to Tukey's multiple range test using Sisvar program version 5.3.

Acknowledgements

This work was supported by Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

References

- Al Hakimi AP, Monneveux and Galiba G. (1995) Soluble sugars, proline and Relative Water Content (RWC) as traits for improving drought tolerance and divergent selection for RWC from *T. polonicum* into *T. durum*. *Journal of Genetics and Breeding*, **49**, 237-244.
- Arvinth S, Arun S, Selvakesavan RK, Srikanth J, Mukunthan N, Kumar PA, Premachandran MN, Subramonian N. (2010) Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with *cry1Ab* for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. *Plant Cell Reports*, **29** 383-395.
- Asghar R, Fenton RD, Demason DA, Close TJ. (1994) Nuclear and cytoplasmic localization of maize embryo and aleurone dehydrin. *Protoplasma*, **177**, 87-94.
- Assad ED. (1994) Rainfall in the cerrado zone. Analysis and regionalization. 423 pp. ISBN 85-7075-004-8 Record Number 19951908346.
- Basnayake SWV, Morgan TC, Wu L, Birch RG. (2012) Field performance of transgenic sugarcane expressing isomaltulose synthase. *Plant Biotechnology Journal*, **10**, 217-225
- Belintani NG, Guerzoni JTS, Moreira RMP, Vieira LGE. (2012) Improving low-temperature tolerance in sugarcane by expressing the *ipt* gene under a cold inducible promoter. *Biologia Plantarum*, **56**, 71-77.
- Bhatnagar-Mathur P, Devi JM, Lavanya M, Reddy DS, Vadez V, Serraj R, Yamaguchi-Shinozaki K, Sharma KK. (2007) Stress-inducible expression of *AtDREB1A* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water limiting conditions. *Plant Cell Reports*, **26**, 2071-2082.

- Bihani P, Char B, Bhargava S. (2011) Transgenic expression of sorghum DREB2 in rice improves tolerance and yield under water limitation. *Journal of Agricultural Science*, **149**, 95-101.
- Bower R, Elliot AR, Potier BAM, Birch RG. (1996) High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane using visible or selectable markers. *Molecular Breeding*, **2**, 239-249.
- Busk PK, Jensen AB, Pages M. (1997) Regulatory elements in vivo in the promoter of the abscisic acid responsive gene *rab17* from maize. *The Plant Journal*, **11**, 1285-1295.
- Chen JQ, Meng XP, Zhang Y, Xia M, Wang XP. (2008) Overexpression of *OsDREB* genes lead to enhanced drought tolerance in rice. *Biotechnology Letters*, **30**, 2191-2198.
- Claeys H and Inzé D. (2013) The Agony of Choice: How Plants Balance Growth and Survival under Water-Limiting Conditions. *Plant Physiology*, **162**, 1768-1779.
- Crago CL, Khanna M, Barton J, Giuliani E, Amaral W. (2010) Energy Efficiency Policies and Strategies with regular papers. Competitiveness of Brazilian sugarcane ethanol compared to US corn ethanol. *Energy Policy*, **38**, 7404-7415.
- Cui M, Zhang W, Zhang Q, Xu Z, Zhu Z, Duan F, Wu R. (2012) Induced overexpression of the transcription factor *OsDREB2A* improves drought tolerance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, **23**, 243-250.
- Embrapa (2009).
http://www.cnps.embrapa.br/zoneamento_cana_de_acucar/ZonCana.pdf. Cited 11 Jul 2013.

- Fernandez-Aunion C, Hamouda TB, Iglesias-Guerra F, Argandona M, Reina-Bueno M, Nieto JJ, Aouani ME, Vargas C. (2010) Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. *BMS Microbiology*, **10**, 192.
- Gaxiola RA, Edwards M, Elser JJ. (2011) A transgenic approach to enhance phosphorus use efficiency in crops as part of a comprehensive strategy for sustainable agriculture. *Chemosphere*, **84** 840-845.
- Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF. (2000) Overexpression of *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology*, **124**, 1854-1865.
- Goddijn OJ, Verwoerd TC, Voogd E, Krutwagen RW, de Graaf PT, van Kun K, Poels J, Ponstein AS, Damm B, Pen J. (1997) Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiology*, **113**, 181-190.
- Golldack D, Lüking I, Yang O. (2011) Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Reports*, **30**, 1383-1391.
- Harrison MD, Geijskes J, Coleman HD, Shand K, Kinkema M, Palupe A, Hassall R, Sainz M, Lloyd R, Miles S, Dale JL. (2011) Accumulation of recombinant cellobiohydrolase and endoglucanase in the leaves of mature transgenic sugar cane. *Plant Biotechnology Journal*, **9**, 884-896.

- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A. Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling & Behavior*, **7**, 1456-1466.
- Hoekstra FA and Buitink J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, **8**, 431-438.
- Holmström KO, Mantylä E, Welin B, Mandal A, Palva ET, Tunnela OE, Lonsdale J. (1996) Drought tolerance in tobacco. *Nature*, **379**, 683-684.
- Hsiao TC. (1973). Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **24**, 519-570.
- Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, Bonnett GD, Maclean DJ, Manners JM. (2004) Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter*, **22**, 325-337.
- Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2006) Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant and Cell Physiology*, **47**, 141-153.
- Kameli A and Losel DM. (1993) Carbohydrates and water status in wheat plants under water stress. *New Phytologist*, **125**, 609-614.
- Kashiwagi J, Krishnamurthy L, Upadhyaya HD, Krishna H, Chandra S, Vadez V, Serraj R. (2005) Genetic variability of drought-avoidance root traits in the mini-core germplasm collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica*, **146**, 213-222.

- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, **17**, 287-291.
- Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2004) A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiology*, **45**, 346-350.
- Kim S, Kang JY, Cho DI, Park JH, Kim SY. (2004) ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *The Plant Journal*, **40**, 75-87.
- Kizis D, Pagès M. (2002) Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *The Plant Journal*, **30**, 679-689.
- Lata C, Prasad, M. (2011) Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 4731-4748.
- Lawlor DW. (2013) Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *Journal of Experimental Botany*. **63**, 695-709.
- Liu JJ, Krenz DC, Galvez AF and de Lumen BO. (1998) Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. *Plant Science*, **134**, 11-20.

- Liu S, Wang X, Wang H, Xin H, Yang X, Yan J, Li J, Tran LS, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Qin F. (2013) Genome-Wide Analysis of *ZmDREB* Genes and Their Association with Natural Variation in Drought Tolerance at Seedling Stage of *Zea mays* L. *PLoS Genetics*, **9**, e1003790.
- Mahajan S, Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **444**, 139-158.
- Matin MA, Brown JH, Ferguson H. (1989) Leaf water potential, relative water content, and diffusive resistance as screening techniques for drought resistance in barley. *Agronomy Journal*, **81**, 100-105.
- Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2012) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochemical and Biophysical Acta*, **1819**, 86-96.
- Molinari HBC, Marur CJ, Daros E, de Campos MKF, de Carvalho JFRP, Bessalho Filho JC, Pereira LFP, Vieira LGE. (2007) Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress *Physiologia Plantarum*, **130**, 21-229.
- Morran S, Eini O, Pyvovarenko T, Parent B, Singh R, Ismagul A, Eliby S, Shirley N, Langridge P, Lopato S. (2011) Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of the expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnology Journal*, **9**, 230-249.
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques*, **32**, 1372-1378.

- Murashige T and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
- Nakano, O. (2011) Entomologia Econômica. 464p. Piracicaba: Editora independente.
- Nogueira RL, Dias BBA, Kobayashi AK, Molinari, HBC. (2012) Functional validation of drought tolerance-related genes from *Saccharum* spp. in model plants. In: Resumos do 58° Congresso Brasileiro de Genética, ISBN 978-85-89109-06-2.
- Oh SJ, Song SI, Kim YS, Jang HJ, Kim SY, Kim M, Kim YK, Nahm BH, Kim JK. (2005) *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiology*, **138**, 341-351.
- Olsson M. (1995) Alterations in lipid composition, lipid peroxidation and anti-oxidative protection during senescence in drought stressed plants and non-drought stressed plants of *Pisum sativum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **33**, 547-553.
- Papini-Terzi FSP, Rocha FR, Vêncio RZN, Felix JM, Branco DS, Waclawovsky AJ, Bern LEV, Lembke CG, Costa MDL, Nishiyama Jr M, Vicentini R, Vincentz MGA, Ulian EC Menossi M, Souza GM (2009) Sugarcane genes associated with sucrose content. *BMC Genomics* 10:120 doi:10.1186/1471-2164-10-120
- Passioura J. (2012) Phenotyping for drought tolerance in grain crops: when is it useful to breeders? *Functional Plant Biology*, **39**, 851-859.
- Passioura JB, Condon AG, Richards RA (1993) Water deficits, the development of leaf area and crop productivity. In: Smith JAC, Griffiths H (eds) Water deficits. Plant responses from cell to community. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp253-264.

- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, **26**, 509-515.
- Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran LSP, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2007) Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stress in *Zea mays* L. *The Plant Journal*, **50**, 54-69.
- Rogelj J, McCollum DL, Reisinger A, Meinshausen M, Riahi K. (2013) Probabilistic cost estimates for climate change mitigation, *Nature*, **493**, 79-83.
- Rorat T. (2006) Plant dehydrins-tissue location, structure and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*, **11**, 536-556.
- Saint Pierre C, Crossa JL, Bonnett D, Yamaguchi-Shinozaki K, Reynolds MP. (2012) Phenotyping transgenic wheat for drought resistance. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 1799-1808.
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **290**, 998-1009.
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Sek, M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2006) Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **103**, 18828-18833.

- Sanford JC, Smith FD and Russell JA. (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology*, **217**, 483-510.
- Savage N. (2011) Fuel options: The ideal biofuel. *Nature*, **474**, S9-S11.
- Schramm F, Larkindale J, Kiehlmann E, Ganguli A, English G, Vierling E, von Koskull-Döring P. (2008) A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **53**, 264-274.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (1999) Molecular responses to drought stress. In *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*, Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., eds (Austin, TX: R.G. Landes), pp. 11-28.
- Silva MA, Carlin SD, Perecin D. (2004) Fatores que afetam a brotação inicial da cana-de-açúcar. *Revista Ceres*, **51**, 457-466.
- Sugiharto B. (2004) Biochemical and molecular studies on sucrose-phosphate synthase and drought inducible-protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *J Ilmu Dasar* **5**: 62-67.
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **29**, 417-426.
- UNICA (2013). http://www.brazil.org.uk/commercial/ftagriculture_files/ftsummit.02.unica.pdf. Cited 15 Jun 2013.

- van der Merwe MJ, Groenewald JH, Stitt M, Kossmann J, Botha FC. (2010) Downregulation of pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase activity in sugarcane culms enhances sucrose accumulation due to elevated hexose-phosphate levels. *Planta*, **231**, 595-608.
- van Dillewijn C. (1952) Botany of sugar cane. Waltham: Chronica Botanica, p 371.
- Vilardell J, Goday A, Freire MA, Torrent M, Martínez MC, Torné JM, Pagès M. (1990) Gene sequence, developmental expression and protein phosphorylation of *rab17* in maize. *Plant Molecular Biology*, **14**, 423-432.
- Vilardell J, Mundy J, Stilling B, Leroux B, Pla M, Freyssinet G, Pages M. (1991) Regulation of the maize *rab17* promoter in transgenic heterologous systems. *Plant Molecular Biology*, **17**, 985-993.
- Wang Q, Guan Y, Wu Y, Chen H, Chen F, Chu C. (2008) Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. *Plant Molecular Biology*, **67**, 589-602.
- Weng LX, Deng HH, Xu JL, Li Q, Zhang YQ, Jiang ZD, Li QW, Chen JW, Zhang LH. (2011) Transgenic sugarcane plants expressing high levels of modified *cryIAC* provide effective control against stem borers in field trials. *Transgenic Research*, **20**, 759-772.
- Woo NS, Badger MR, Pogson BJ. (2008) A rapid, non-invasive procedure for quantitative assessment of drought survival using chlorophyll fluorescence. *Plant Methods* **4**, 27.
- Wu L and Birch RG. (2007) Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer *Plant Biotechnology Journal*, **5** 109-117.

- Wu L and Birch RG. (2010) Physiological basis for enhanced sucrose accumulation in an engineered sugarcane cell line *Functional Plant Biology*, **37**, 1161-1174.
- Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K: (1994) A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, **6**, 251-264.
- Yooyongwech S, Cha S, Supaibulwatana K. (2013) Water relation and aquaporin genes (*PIP1-2* and *PIP2-1*) expression at the reproductive stage of rice (*Oryza sativa* L. spp. *indica*) mutant subjected to water deficit stress. *Plant Omics Journal*, **6**, 79-85.
- Yoshida T, Ohama N, Nakajima J, Kidokoro S, Mizoi J, Nakashima K, Maruyama K, Kim J-M, Seki M, Todaka D, Osakabe Y, Sakuma Y, Schöffl F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2011) Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetics and Genomics*, **286**, 321-332.
- Zhang SZ, Yang BP, Feng CL, Chen RK, Luo JP, Cai WW, Liu FH. (2006) Expression of the *Grifola frondosa* trehalose synthase gene and improvement of drought-tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) *Journal of Integrative Plant Biology*, **48**, 453-459.
- Zhu YJ, McCafferty H, Osterman G, Lim S, Agbayani R, Lehrer A, Schenck S, Komor E. (2011) Genetic transformation with untranslatable coat protein gene of sugarcane yellow leaf virus reduces virus titers in sugarcane. *Transgenic Research*, **20**, 503-512.

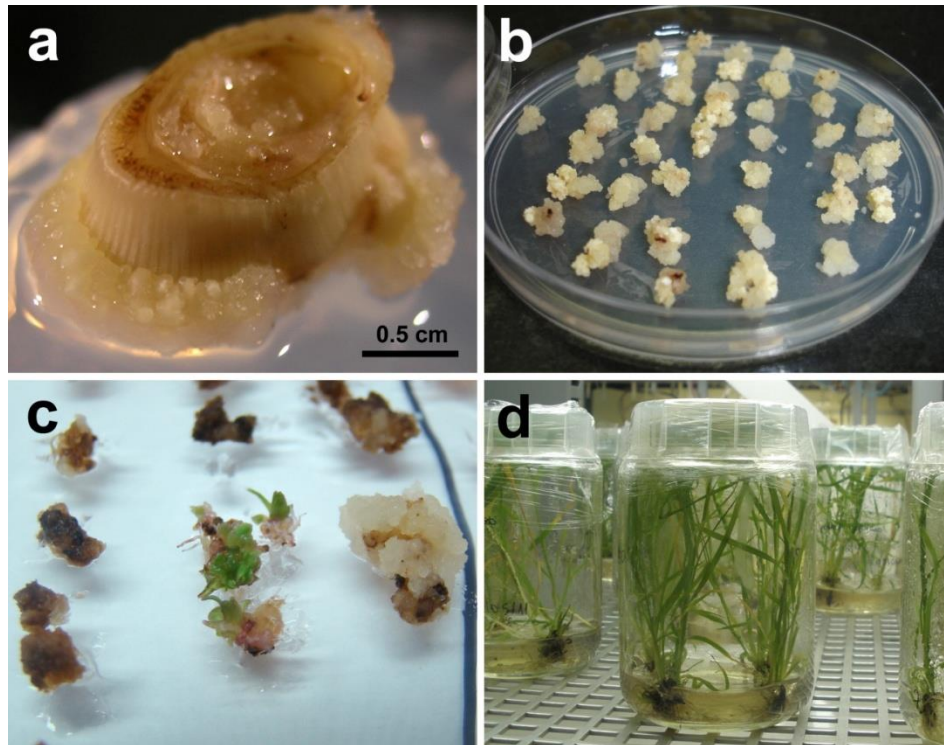


Figure S1 Tissue culture and genetic transformation of sugarcane RB855156. (a) development of embryogenic callus; (b) multiplication of the embryogenic callus for transformation via particle bombardment; (c) transgenic plant regeneration on selective medium and (d) whole plant regeneration and multiplication



Figure S2 Leaf symptoms after spraying with 1% glufosinate ammonium after 8 days (A and B, respectively). C- Control non-transgenic plant, T- Transgenic plant.

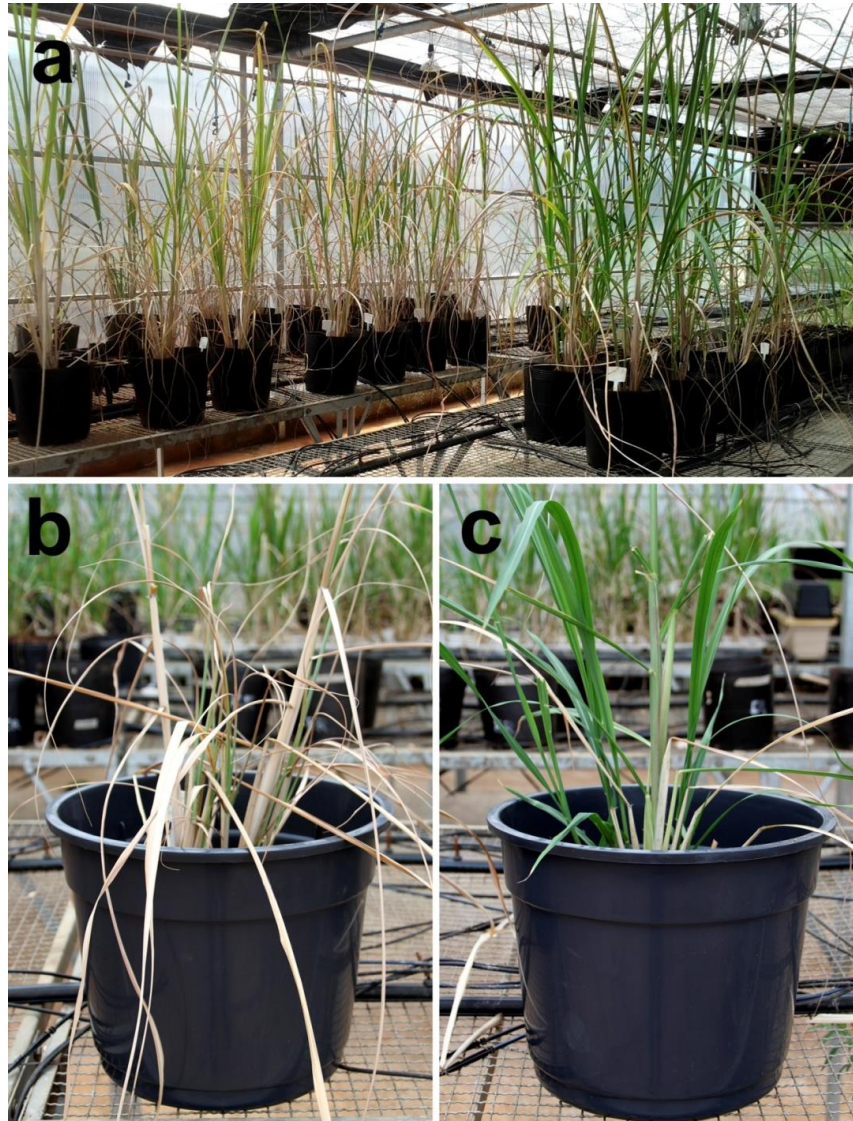


Figure 1 Behavior of sugarcane with drought-inducible expression of *AtDREB2A CA* during preliminary ‘survival’ drought tolerance tests. Three-month-old plants submitted to 6 days of withholding water (a). One-month-old control non-transgenic plant (b) and transgenic event (24.2) (c) were grown in 8-liter plastic pots and submitted to water deficit by withholding irrigation for 21 days.

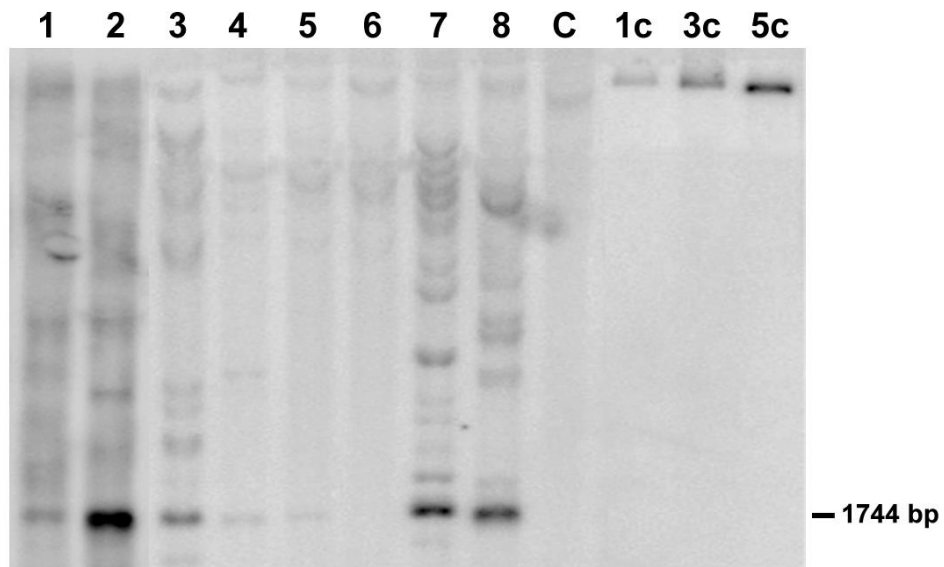


Figure 2 Southern blot analysis of genomic DNA from transgenic sugarcane plants hybridized with *Rab17::DREB2A CA::TNos* probe. Lane C, non-transgenic sugarcane plant (control); Lanes 1-8, genomic DNA from independent transgenic sugarcane lines digested with *BcII* lane 1, C1B1; lane 2, 3/2; lane 3, B5.P2; lane 4, B5.P5; lane 5, B9P2; lane 6, B9P3; lane 7, B6P4; lane 8, 24.2. Lanes 1c, 3c and 5c, pBract302 vector linearized with *SspI*, corresponding to 1, 3 and 5 copies of the transgene, respectively.

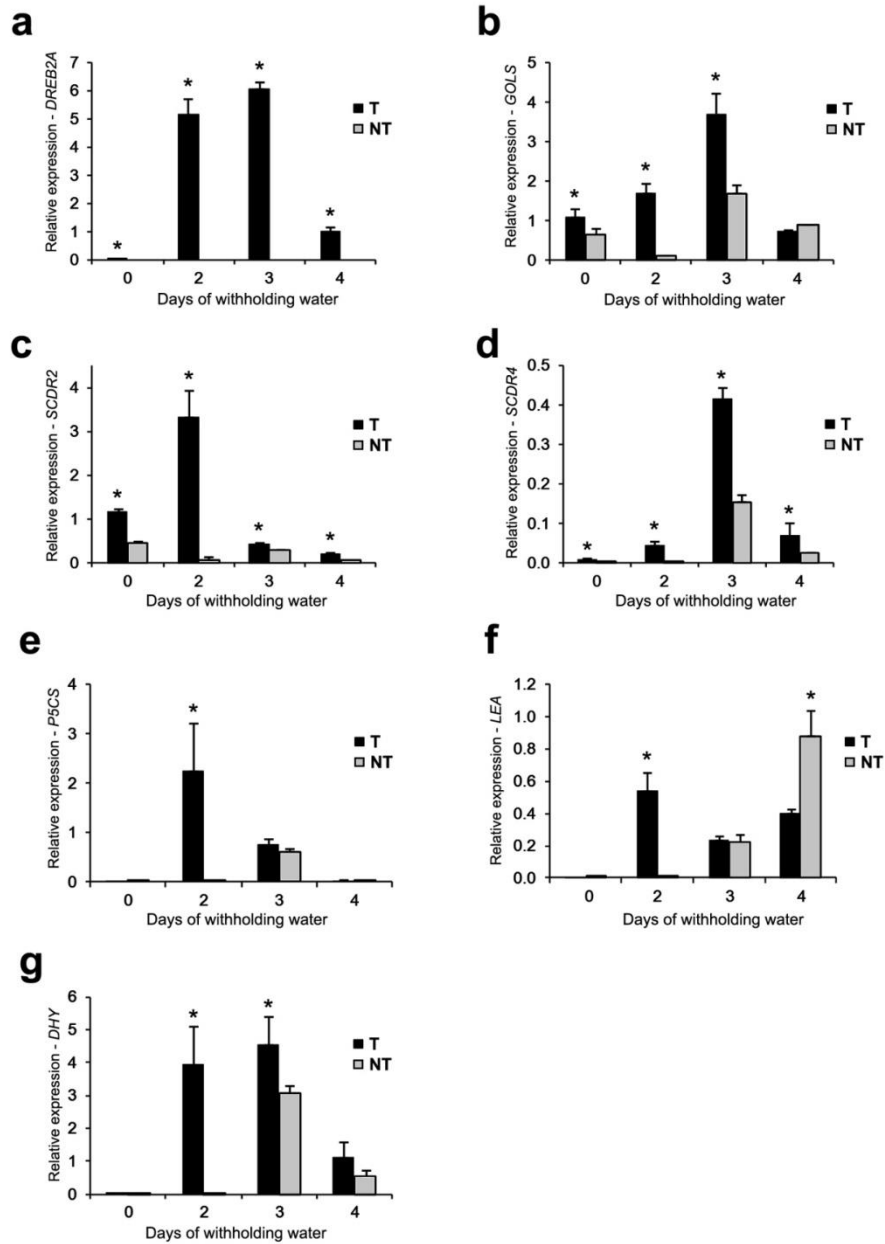


Figure 3 Transcripts abundance of *AtDREB2A* CA (A) and genes up-regulated (B, C, D, E, F and G) during drought treatment. The geometrical mean of *GAPDH* and *25S rRNA*

was used as a reference to measure the relative quantification that corresponds to the mean of three biological repetitions \pm SE. The genes names are indicated in the histograms. In each case, values of relative quantification correspond to the mean of at least three biological repetitions \pm SE. Statistical differences (* p <0.05) were analyzed with ANOVA followed by Tukey's test.

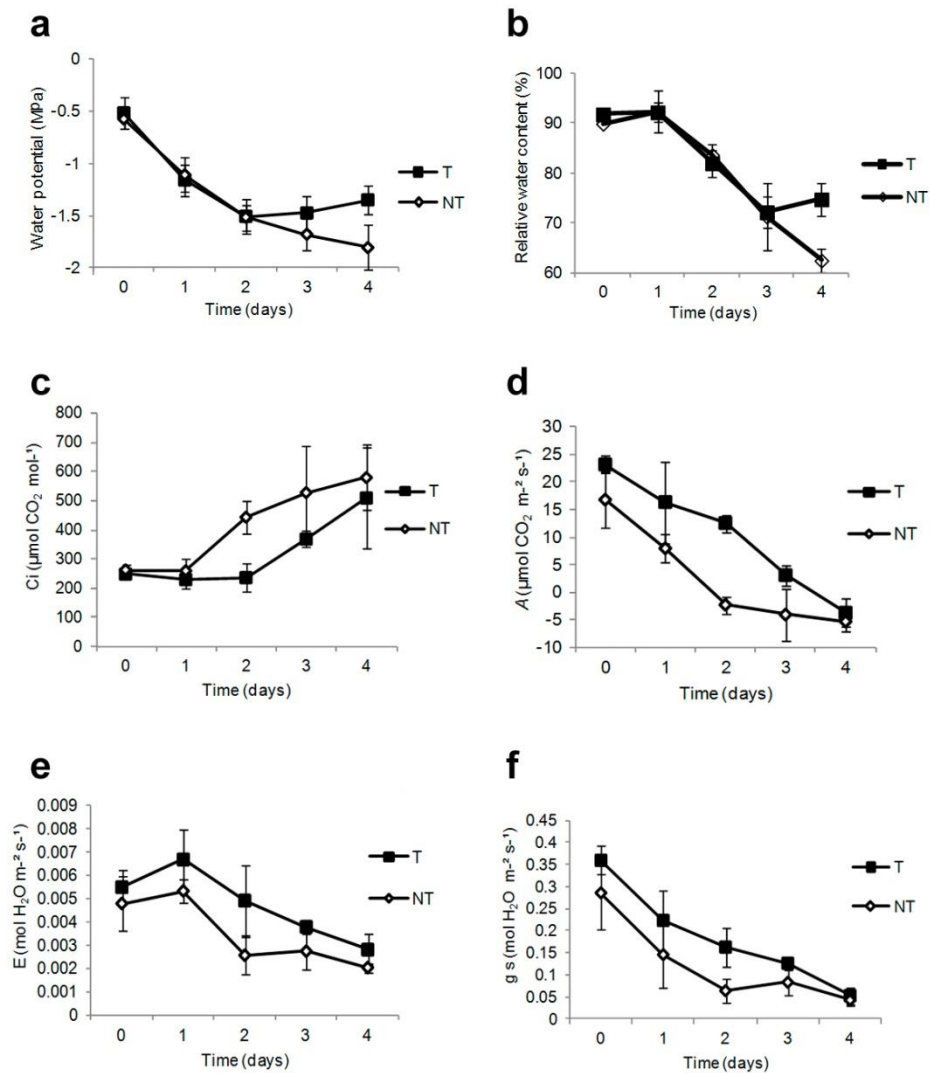


Figure 4 Physiological characterization of transgenic (T) and non-transgenic (NT) sugarcane plants under water deficit for four days after withholding water. Water potential (Ψ_L) (a), Relative Water Content (RWC) (b), and gas exchange characteristics including concentrations of CO_2 in the substomatic chamber (C_i) (c), net photosynthesis rate (A) (d), transpiration (E) (e), stomatal conductance (g_s) (f). Values are the mean \pm C.I. ($n = 5$). Statistical differences ($*p < 0.05$) were analyzed with ANOVA followed by Tukey's test.

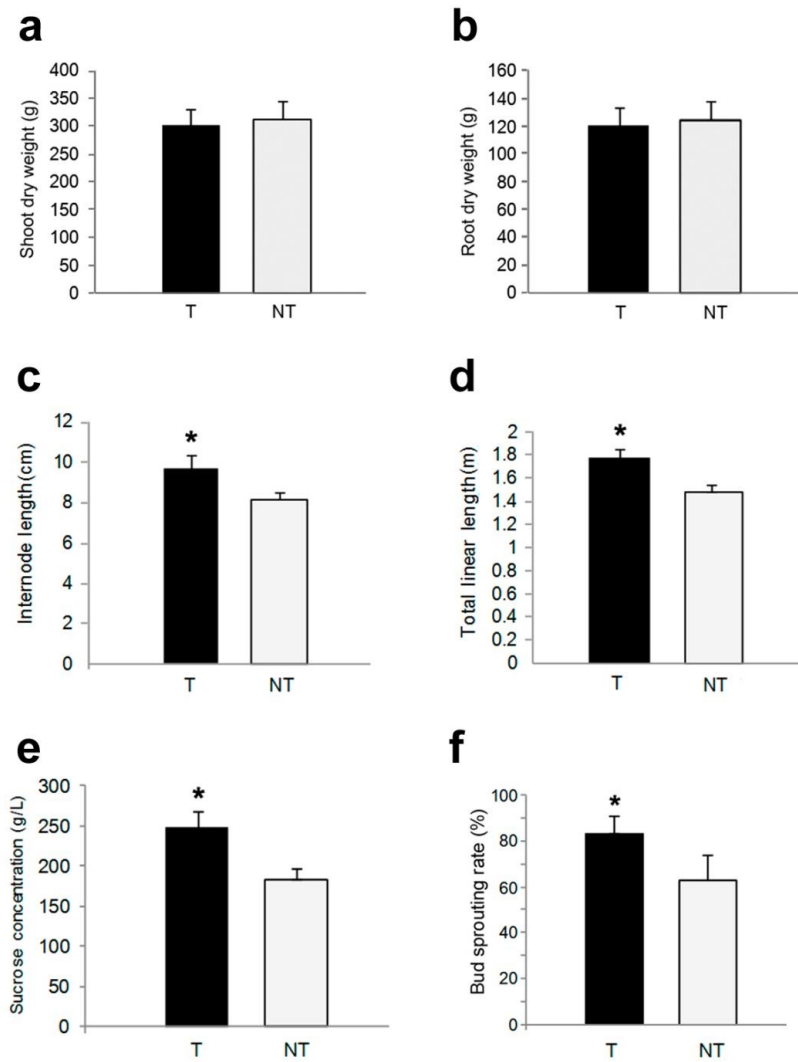


Figure 5 Agronomic characterization of transgenic (T) and non-transgenic (NT) sugarcane plants four days after withholding water. Shoot dry weight (a), root dry weight (b), internode length (c), culm total linear length (d), sucrose content (e), bud sprouting rate (f). Values are the mean \pm C.I. ($n = 5$). Statistical differences ($*p < 0.05$) were analyzed with ANOVA followed by Tukey's test.

Table 1. PCR primers

Oligo name	Name of gene	Sequence ID*	Orientation	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Average primer efficiency
<i>pGAPDH-F</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	CA254672	Sense	CACGGCCACTGGAAGCA	101	1.915
<i>pGAPDH-R</i>		CA254672	Antisense	TCCTCAGGGTTCCTGATGCC		
<i>p25S rRNA-F</i>	25S ribosomal RNA	BQ536525	Sense	GCAGCCAAGCGTTCATAGC	108	1,915
<i>p25S rRNA-R</i>		BQ536525	Antisense	CCTATTGGTGGGTGAACAA-TCC		
<i>pDREB2A-F</i>	Dehydration-responsive element-binding protein 2A	AY063972	Sense	CAGTGTTGCCAACGGTTCAT	59	1.989
<i>pDREB2A-R</i>		AY063972	Antisense	GTAGCGGATCAAAACCAC-TTTGT		
<i>pGOLS-F</i>	Galactinol synthase	TC114091	Sense	AGTACAGCCGATCCCGAAC	101	1.911
<i>pGOLS-R</i>		TC114091	Antisense	GCAGTAGTGCACGGCCTTC		
<i>pSCDR2-F</i>	<i>Saccharum</i> drought responsive 2	TC134397	Sense	CCGTTGCGCAGATTCAT	100	1.937
<i>pSCDR2-R</i>		TC134397	Antisense	ATGTCCGCCTCCTAGAAGCA		
<i>pSCDR4-F</i>	<i>Saccharum</i> drought responsive 4	TC125486	Sense	ACGAGGAGCAGAGCTATGGT	104	1.928
<i>pSCDR4-R</i>		TC125486	Antisense	CGTTTTGGCTTCGGGTAA		
<i>pP5CS-F</i>	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	TC112688	Sense	CCTGATGCCTTGGTCCAGA	100	1.895
<i>pP5CS-R</i>		TC112688	Antisense	TGCAATACTGTGTTTGATCT-CATGG		
<i>pLEA-F</i>	Late embryogenic abundant	CA094376	Sense	TGTTTCTCCATCTCCCGAGTG	105	1.895
<i>pLEA-R</i>		CA094376	Antisense	CATGGCAGGGTCTCTCAAGC		
<i>pDHY-F</i>	Dehydrin	TC114145	Sense	ACCAGTACGGCAATCCAGTTG	147	1.776
<i>pDHY-R</i>		TC114145	Antisense	CGGAGCGATGCAGGATG		

*TC derived from Sugarcane Gene Index 3.0, remaining sequence IDs from Genbank (NCBI)

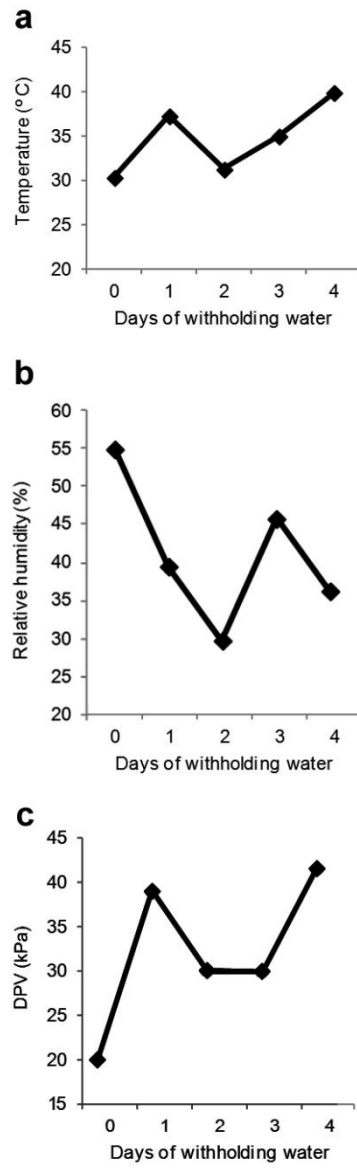


Figure S3 Climatic conditions including temperature (a), relative humidity (b) and DPV (c) during the experimental period.

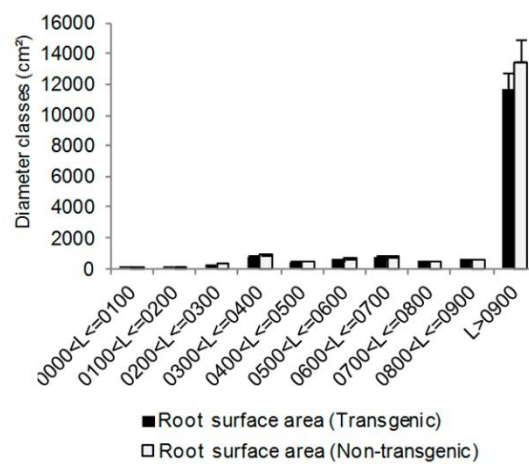


Figure S4 Root surface area of transgenic (T) and non-transgenic (NT) plants four days after withholding water. Values are the mean \pm C.I. ($n = 5$). Statistical differences ($*p < 0.05$) were analyzed with ANOVA followed by Tukey's test.

(VERSÃO PRELIMINAR DO ARTIGO)