

MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H<sup>+</sup> NO DESENVOLVIMENTO  
VEGETAL: PAPEL NO METABOLISMO DE AÇÚCARES E NAS  
RESPOSTAS ADAPTATIVAS DAS PLANTAS AO ESTRESSE  
HÍDRICO

JOSIMARA BARCELOS VENANCIO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ  
JULHO – 2013

MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H<sup>+</sup> NO DESENVOLVIMENTO  
VEGETAL: PAPEL NO METABOLISMO DE AÇÚCARES E NAS  
RESPOSTAS ADAPTATIVAS DAS PLANTAS AO ESTRESSE  
HÍDRICO

JOSIMARA BARCELOS VENANCIO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JULHO – 2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 125/2013

Venancio, Josimara Barcelos

Modulação das bombas de H<sup>+</sup> no desenvolvimento vegetal: papel no metabolismo de açúcares e nas respostas adaptativas das plantas ao estresse hídrico / Josimara Barcelos Venancio. – 2013.

137 f. : il.

Orientador: Arnold Rocha Façanha.

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Sistemas de transporte primário 2. Membrana plasmática 3. Vacúolo 4. Bioenergia 5. Estresse hídrico I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 571.2

MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H<sup>+</sup> NO DESENVOLVIMENTO  
VEGETAL: PAPEL NO METABOLISMO DE AÇÚCARES E NAS  
RESPOSTAS ADAPTATIVAS DAS PLANTAS AO ESTRESSE  
HÍDRICO

JOSIMARA BARCELOS VENANCIO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Aprovada em 17 de Julho de 2013.

Comissão Examinadora:

---

Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira (D.Sc., Química Biológica) – UENF

---

Dra. Inga Gonçalves de Azevedo (D. Sc., Biociências e Biotecnologia) - UENF

---

Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira (D.Sc., Fisiologia Vegetal) – ESALQ/USP

---

Dr. Arnaldo Rocha Façanha – (D. Sc., Química Biológica) - UENF  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todo seu amor e cuidado, por colocar pessoas na caminhada que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal;

À minha amada família, meus pais, minha irmã e meu cunhado pelo amor e incentivo que me proporcionaram em todos os momentos;

A UENF e a FAPERJ pela concessão da bolsa e pela oportunidade de desenvolver este projeto;

Ao meu orientador Dr. Arnaldo Rocha Façanha que guiou com segurança o meu trajeto na construção e no desenvolvimento deste trabalho;

À Dr. Michelle G. Catunda que me ensinou os primeiros passos no laboratório (a primeira dosagem de proteína, a primeira hidrólise...), ainda na iniciação científica;

À Dr. Liane, com quem trabalhei esses quatro anos, sua amizade e ajuda foi de fundamental importância durante estes quatro anos;

À Professora Anna Okorokova pelos seus ensinamentos e principalmente por sua ajuda na submissão do artigo científico;

Ao Professor Claudio Retamal por abrir as portas do seu laboratório para que fossem realizados os experimentos de imunomarcção e pelas análises dos resultados;

Ao LBCT, em especial a Bia e Giovana, pela ajuda no preparo de amostras;

A PESAGRO, pela parceria para manter as plantas no campo, e especialmente ao Saul, que nos ajudou a cultivar e a colher as plantas;

Às minhas queridas amigas Inga, Julianna, Janaína e Amanda, pela grandiosa ajuda em várias etapas deste trabalho, mas principalmente pela

amizade, pelo convívio, pelos momentos de risos que dividimos durante todo este período;

Aos colegas de laboratório pelo harmonioso ambiente de trabalho;

À amiga e irmã Thatiana, com quem convivi e dividi muitos risos, choro, obrigada por me ouvir quando precisei, e por seus conselhos, enfim por tudo;

A Gislane, amiga querida no decorrer destes dois últimos anos, obrigada pelos momentos de alegria e amizade;

Aos meus familiares e amigos que sempre estiveram me acompanhando e torcendo por mim.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Sistemas de Transporte Primários da Célula Vegetal.....	4
2.2. Bombas de H <sup>+</sup> .....	5
2.2.1. H <sup>+</sup> -ATPase tipo P.....	5
2.2.2. H <sup>+</sup> -ATPase tipo V.....	6
2.2.3. H <sup>+</sup> -PP <sub>i</sub> ase.....	8
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	11
4. CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS BOMBAS DE H <sup>+</sup> PARA O DESENVOLVIMENTO DE GERMOPLASMAS DE CANA-DE-AÇÚCAR MAIS EFICIENTES NA PRODUÇÃO DE BIOENERGIA.....	17
RESUMO.....	17
4.1. INTRODUÇÃO.....	19
4.2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
4.2.1. Importância da cana-de-açúcar para o Brasil.....	22
4.2.2. Aspectos fisiológicos da cana-de-açúcar.....	24
4.2.3. Enzimas do metabolismo de açúcares.....	26
4.2.4. Bombas de H <sup>+</sup> e sua relação com a produtividade.....	28

4.3. OBJETIVO GERAL.....	30
4.3.1. Objetivos específicos.....	30
4.4. METODOLOGIA.....	32
4.4.1. Material vegetal.....	32
4.4.2. Emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	33
4.4.3. Teor de pigmentos totais.....	33
4.4.4. Trocas gasosas.....	34
4.4.5. Análises morfológicas.....	34
4.4.6. Análises anatômicas.....	34
4.4.7. Extração de açúcar total e determinação do teor de sacarose, glicose e frutose.....	35
4.4.8. Extração da sacarose fosfato sintase (SPS) e da invertase ácida solúvel (IAS).....	35
4.4.9. Atividade da sacarose fosfato sintase (SPS) e da invertase ácida vacuolar (IAV).....	36
4.4.10. Preparação da fração microsomal.....	36
4.4.11. Determinação da atividade H <sup>+</sup> -ATPásica e H <sup>+</sup> -pirofosfatásica.....	37
4.4.12. Monitoramento do gradiente de H <sup>+</sup> .....	37
4.4.13. Imunoblotting.....	38
4.4.14. Análises dos dados.....	39
4.5. RESULTADO.....	40
4.5.1. Capacidade fotossintética de plantas jovens de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose.....	40
4.5.2. Características morfológicas e anatômicas de plantas jovens de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose.....	44
4.5.3. Conteúdo de açúcares e atividade da SPS e da IAV em plantas jovens de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose.....	48
4.5.4. Atividade e expressão das bombas de H <sup>+</sup> de membrana plasmática e de vacúolo em plantas jovens de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose.....	49
4.5.5. Atividade e expressão das bombas de H <sup>+</sup> de membrana plasmática e de vacúolo em tecidos do colmo e da casca de plantas adultas de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose.....	56

4.5.6. Cinética das bombas de H <sup>+</sup> de membrana plasmática e de vacúolo em genótipos de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose.....	64
4.6. DISCUSSÃO.....	68
4.7. CONCLUSÃO.....	78
4.8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	79
5. CAPÍTULO 2 – MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H <sup>+</sup> VACUOLARES NAS RESPOSTAS DAS ESPÉCIES <i>Z. mays</i> L. E <i>C. rotundus</i> A DEFICIÊNCIA HÍDRICA.....	86
RESUMO.....	86
5.1. INTRODUÇÃO.....	88
5.2. REVISÃO DE LITERATURA.....	91
5.2.1. Respostas fisiológicas das plantas ao estresse hídrico.....	91
5.2.2. Bombas de H <sup>+</sup> vacuolares e sua relação com estresses ambientais.....	93
5.2.3. Modelos de estudo.....	95
5.2.3.1. <i>Zea mays</i> L.....	95
5.2.3.2. <i>Cyperus rotundus</i> .....	96
5.3. OBJETIVO GERAL.....	98
5.3.1. Objetivos específicos.....	98
5.4. METODOLOGIA.....	100
5.4.1. Material vegetal.....	100
5.4.2. Preparação da fração microssomal.....	100
5.4.3. Determinação da atividade H <sup>+</sup> -ATPásica e H <sup>+</sup> -pirofosfatásica.....	101
5.4.4. Monitoramento do gradiente de H <sup>+</sup> .....	102
5.4.5. Imunoblotting.....	102
5.5. RESULTADO.....	104
5.6. DISCUSSÃO.....	111
5.7. CONCLUSÃO.....	116
5.8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	117
6. CONCLUSÃO FINAL.....	124

## RESUMO

VENANCIO, Josimara B. Dsc. – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Julho de 2013. MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H<sup>+</sup> NO DESENVOLVIMENTO VEGETAL: PAPEL NO METABOLISMO DE AÇÚCARES E NAS RESPOSTAS ADAPTATIVAS DAS PLANTAS AO ESTRESSE HÍDRICO. Orientador: Arnaldo Rocha Façanha.

Em nível celular, o crescimento e o desenvolvimento vegetal são controlados direta e indiretamente por sistemas de transdução de energia que nas células vegetais, consistem principalmente em um sistema integrado de bombas protônicas. Estas enzimas acoplam a energia da hidrólise de seus substratos (ATP ou PP<sub>i</sub>) ao transporte de H<sup>+</sup> gerando uma diferença de potencial eletroquímico, que é requerido para a captação, o transporte e o acúmulo de nutrientes, incluindo a translocação e compartimentalização de fotoassimilados. As bombas de H<sup>+</sup> controlam uma miríade de funções relacionadas ao crescimento vegetal, dentre as quais a manutenção do pH intracelular e o fluxo iônico são essenciais para a adaptação das plantas às condições de estresse ambiental. No primeiro capítulo avaliou-se a modulação das bombas de H<sup>+</sup>, da membrana plasmática e do vacúolo, em genótipos de cana-de-açúcar comerciais com distintos potenciais para acumular sacarose e biomassa. Os resultados mostraram uma ativação diferencial das H<sup>+</sup>-ATPases e das H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ases, em tecidos de colmos de mudas e de plantas em fase de produção. Em colmos

maduros destaca-se a atividade superior identificada na casca em relação às de tecidos internos do colmo. Entretanto, nos tecidos de armazenamento (colmo) observa-se a maior eficiência no acoplamento destas enzimas, sobretudo, nos híbridos que acumulam mais sacarose. O conjunto de dados apresentados neste capítulo permite inferir sobre padrões de ativação destas enzimas comuns a genótipos com alto potencial produtivo. A eficiência destas bombas de  $H^+$  parece ser um dos pontos chave para o entendimento dos mecanismos pelos quais esta espécie consegue acumular altas concentrações de sacarose em seus tecidos. No segundo capítulo estudou-se a participação das bombas de  $H^+$  vacuolares nos mecanismos de adaptação à seca desenvolvidos por plântulas de milho comparativamente aos mecanismos que evoluíram naturalmente em uma das mais resistentes e invasivas ervas daninhas, a tiririca. A  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase mostrou ser a principal enzima modulada tanto no milho quanto na tiririca, com atividade reduzida durante o estresse hídrico e uma superativação após a reirrigação das plantas. Os dados apresentados também fornecem evidências de uma regulação incomum no acoplamento da  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase, que pode ter papel fundamental nas respostas adaptativas das plantas ao estresse hídrico. Em conjunto, os resultados deste trabalho indicam que as bombas de  $H^+$  podem servir como marcadores bioquímicos para seleção de genótipos de interesse tanto em termos de produtividade quanto para resistência a estresses ambientais. Em última instância, o conhecimento gerado neste estudo pode fundamentar futuras estratégias inovadoras no campo do melhoramento vegetal.

## ABSTRACT

VENANCIO, Josimara B. Dsc. – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. July, 2013. MODULATION OF PUMPS H<sup>+</sup> PLANT DEVELOPMENT: THE ROLE OF METABOLISM IN SUGAR AND ADAPTIVE RESPONSES OF PLANTS TO WATER STRESS. Advisor: Arnaldo Rocha Façanha.

At the cellular level, the plant growth and development are controlled directly and indirectly by systems of energy transduction in plant cells that are primarily composed into an integrated proton pumps. These enzymes couple the energy of hydrolysis of its substrates (ATP or PPI) transporting H<sup>+</sup> and generating an electrochemical potential difference, which is required for the uptake, transport and accumulation of nutrients, including compartmentalization and translocation of assimilates. Proton Pumps control several functions related to plant growth, among which the maintenance of intracellular pH and ion fluxes are essential for the adaptation of plants to environmental stress conditions. In the first chapter we evaluated the modulation of H<sup>+</sup> pumps, the plasma membrane and the vacuole in sugar cane genotypes trade with distinct potential to accumulate sucrose and biomass. The results showed a differential activation of H<sup>+</sup>-ATPases and H<sup>+</sup>-PPIases in tissues of stems of seedlings and plants in production. In mature stems highlight the superior activity identified in the shell relative to the inner tissues of the stem. However, tissue storage (stalk) shows the highest efficiency in the

coupling of these enzymes, especially in hybrids that accumulate more sucrose. The data set presented in this chapter allows us to infer patterns of activation of these enzymes common to genotypes with high yield potential. The efficiency of these pumps  $H^+$  seems to be one of the keys to understanding the mechanisms by which this species can accumulate high concentrations of sucrose in their tissues. In the second chapter we studied the involvement of vacuolar  $H^+$  pumps in drought adaptation mechanisms developed by maize seedlings compared to the mechanisms that have evolved naturally one of the most resistant and invasive weeds, purple nutsedge. The  $H^+$ -PPiase proved to be the main enzyme modulated both in maize and in purple nutsedge, with reduced activity during water stress and overactivation after reirrigation of plants. The data presented also provide evidence of a regulatory unusual coupling of  $H^+$ -PPiase, which may have a fundamental role in adaptive responses of plants to water stress. Together, these results indicate that the  $H^+$  pumps may serve as biochemical markers for selection of genotypes of interest both in terms of productivity and resistance to environmental stresses. Ultimately, the knowledge generated in this study may support future innovative strategies in the field of plant breeding.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A opinião pública e o posicionamento das autoridades em nível mundial têm se mobilizado para prover um acompanhamento e um tratamento mais adequado das mudanças climáticas ocorridas no planeta, devido à crescente concentração de gases de efeito estufa, principalmente o dióxido de carbono, o metano e o óxido nitroso. Tais gases são provenientes de atividades industriais, agrícola e de transportes, em função do uso de combustíveis fósseis (Moreira e Giometti, 2008). De acordo com Ricklefs (2009), o desmatamento é responsável pela adição de aproximadamente 2 bilhões de toneladas de carbono na atmosfera por ano, e a queima dos combustíveis fósseis responde por cerca de 5 bilhões de toneladas por ano. Por isso, os biocombustíveis tornam-se cada vez mais atrativos como uma alternativa para contribuir com a redução das emissões de gases estufa na atmosfera, além de, ser produzidos a partir de fontes renováveis (Lima, 2009). Segundo a Empresa de Pesquisa Energética, as enormes perspectivas de crescimento da participação dos biocombustíveis, especialmente etanol, na matriz energética de transportes impõem a necessidade de conhecer com precisão o perfil ambiental destes produtos. Nos combustíveis derivados da biomassa renovável, a quantidade de dióxido de carbono emitida na combustão é compensada pela absorção deste gás através da fotossíntese durante o crescimento (EPE, 2007). Através da fotossíntese, as plantas convertem  $\text{CO}_2$  e

água em carboidratos e liberam o oxigênio molecular na atmosfera. Plantas que apresentam metabolismo C4 são altamente eficientes na conversão de energia radiante em energia química. Elas superam a limitação de CO<sub>2</sub>, já que utilizam este gás de forma mais eficiente e, conseqüentemente, têm maiores taxas de produção líquida em altos níveis de luz do que plantas C3 (Kluge, 2003). A maior afinidade das plantas C4 com altas temperaturas e luminosidades justifica o melhor crescimento destas plantas em solos tropicais, como o Brasil. Além disso, crescem mais rapidamente e produzem mais biomassa por unidade de área foliar que as plantas C3. A cana-de-açúcar é a principal matéria-prima para produção de biocombustíveis no Brasil, enquanto o milho assume esta posição de destaque nos Estados Unidos. E juntos estes dois países lideram a produção de etanol mundial. O crescente interesse por biocombustível implica na necessidade de se aumentar a produtividade destas culturas. Em nível celular o crescimento e desenvolvimento vegetal dependem da eficiência funcional dos sistemas envolvidos no metabolismo energético celular. Os sistemas primários de transporte de H<sup>+</sup> das células vegetais (H<sup>+</sup>-ATPases tipo P e V, e as H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase) acoplam a hidrólise de compostos fosfatados de alta energia (ATP e PPi) à geração de uma força próton-motora que energiza os transportadores secundários responsáveis pela nutrição e manutenção da homeostase celular. Além do transporte de íons e solutos através das membranas, estas enzimas participam de outras funções essenciais ao crescimento da planta, tais como, tolerância a estresses ambientais e regulação do pH citosólico, apoplástico e vacuolar (Gaxiola et al. 2007). Estudos recentes têm demonstrado que plantas transgênicas superexpressando estas enzimas, apresentaram maior resistência a estresses ambientais, além de produtividade aumentada (Lv et al. 2008; Pasapula et al. 2011).

Diante do exposto, foi investigada a hipótese das bombas de H<sup>+</sup> apresentarem uma modulação diferencial tanto no desenvolvimento de genótipos mais produtivos da cana-de-açúcar, quanto nos mecanismos de tolerância à seca nas plantas de milho e tiririca. Para tanto, a presente tese foi dividida em dois capítulos a fim de estudar estes assuntos separadamente. No primeiro capítulo, o genótipo parental *Saccharum spontaneum*, que apresenta baixo acúmulo de

sacarose, característica de rusticidade, e resistência a estresses, e dois híbridos interespecíficos, RB758540 e RB855536, com alto potencial para acumular sacarose, foi caracterizado quanto à sua capacidade fotossintética, de crescimento e de acumulação de açúcares, afim de, correlacionar fenótipos de elevada produtividade com uma possível ativação das bombas de  $H^+$  da membrana plasmática e do vacúolo. O segundo capítulo, foi destinado a estudar a modulação das bombas de  $H^+$  vacuolares nos mecanismo de adaptação à seca na espécie cultivada *Z. mays*, e comparar os resultados obtidos com a resposta de uma espécie rústica, *C. rotundus*. A escolha de modelos de estudo contrastantes, nos dois capítulos, também permitiu realizar uma caracterização dos sistemas de transdução de energia entre as espécies selvagens de metabolismos rústicos (*S. spontaneum* e *C. rotundus*), e espécies selecionadas para o cultivo agrícola (RB758540, RB855536 e *Z. mays*). Desta forma, pode-se gerar informações relevantes a respeito da importância das bombas de  $H^+$  no desenvolvimento de diferentes espécies.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Sistemas de Transporte Primários da Célula Vegetal**

O transporte de moléculas e de íons através da membrana plasmática, e de endomembranas de diferentes organelas celulares, é um processo altamente seletivo e fundamental na manutenção de energia celular. Este processo é desempenhado por complexos proteicos localizados nas membranas, que podem funcionar como proteínas canais, proteínas carreadoras (ou transportadoras) ou, ainda, como bombas eletrogênicas. Em resposta à ação destas proteínas, alguns compostos são acumulados na célula a concentrações bem mais elevadas que as encontradas no ambiente externo, enquanto outros são totalmente excluídos (Taiz e Zeiger, 2004).

Os sistemas de transporte, presentes nas membranas biológicas, podem ser classificados em sistemas primários e sistemas secundários. Os sistemas primários são constituídos pelas bombas eletrogênicas. Estes são responsáveis pelo estabelecimento de um gradiente eletroquímico que é gerado ao transportar íons contra um gradiente de concentração, através da utilização de compostos ricos em energia. Já os sistemas secundários, constituídos pelas proteínas canais e as carreadoras ou transportadoras, são capazes de transportar substratos através da membrana, sem envolver quebra de ligações covalentes. Este processo depende do desequilíbrio de cargas, gerado na membrana, pelos sistemas primários (Logan et al., 1997).

Os principais sistemas de transporte de prótons que energizam o transporte de solutos através das membranas das células vegetais são as H<sup>+</sup>-ATPases do tipo P, H<sup>+</sup>-ATPases do tipo V e H<sup>+</sup>-Pirofosfatases (H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ases). Essas bombas de H<sup>+</sup> estão distribuídas nas diversas membranas celulares. As H<sup>+</sup>-ATPases tipo P estão localizadas na membrana plasmática. As membranas de vacúolos das plantas (tonoplastos) possuem dois tipos distintos de bombas de H<sup>+</sup>: a V-H<sup>+</sup>-ATPases e a H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ases (Rea e Poole, 1993). Estas enzimas são responsáveis pela movimentação de H<sup>+</sup> através de membranas e também constituem as principais enzimas transdutoras responsáveis pela interconversão de energia química, elétrica e luminosa nas células de todos os organismos vivos. Elas acoplam a hidrólise de ATP ou de PP<sub>i</sub>, no caso das H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ases, ao transporte de prótons em membranas de células vegetais e fúngicas, gerando uma diferença de potencial eletroquímico, requerido para o transporte secundário, o qual é completamente dependente da força motriz de H<sup>+</sup> (FPM) (Sanders e Bethke, 2000).

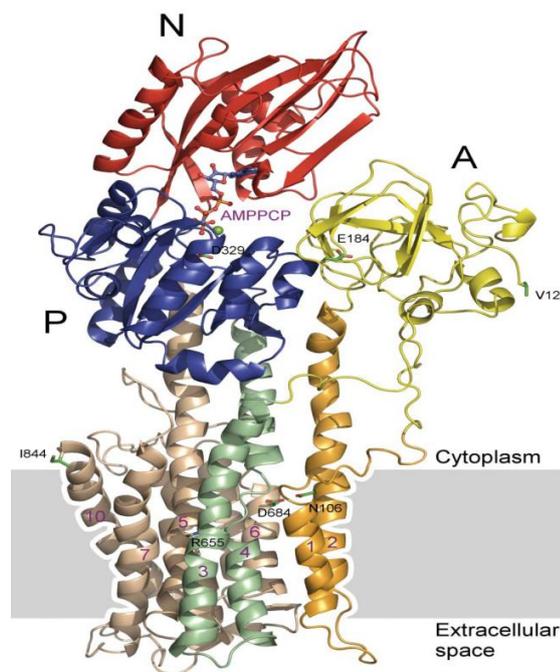
## **2.2. Bombas de H<sup>+</sup>**

### **2.2.1. H<sup>+</sup>-ATPase tipo P**

Na membrana plasmática (MP) localizam-se as H<sup>+</sup>-ATPase tipo P (P-ATPase) (EC 3.6.1.35), as quais acoplam a hidrólise de ATP ao transporte de H<sup>+</sup> para fora da célula (do citoplasma para o apoplasto), tendo seu papel fisiológico associado à nutrição e à expansão celular (Duby e Boutry, 2009). A P-ATPase das plantas consiste de um monômero de cerca de 100 kDa (Briskin et al., 1989), o qual pode se oligamerizar para formar complexos dímeros e hexâmeros (Kanczewska et al., 2005). A região C terminal autoinibitória da H<sup>+</sup>-ATPase de MP pode ser fosforilada servindo como sítio de ligação para as proteínas reguladoras 14-3-3 que ativam as H<sup>+</sup>-ATPases (Fuglsang et al., 1999). Este complexo ativado consiste de um arranjo formado por seis monômeros de H<sup>+</sup>-ATPases arranjados em uma estrutura hexamérica juntamente com seis moléculas de 14-3-3 (Kanczewska et al., 2005). A H<sup>+</sup>-ATPase de MP é regulada mais efetivamente ao nível pós-traducional, principalmente pelo aumento do acoplamento entre o

transporte de  $H^+$  e a hidrólise de ATP, sugerindo que esta enzima pode responder mais rápido aos desafios impostos pelo ambiente (Gaxiola et al., 2007).

Existem onze isoformas da  $H^+$ -ATPase tipo P (*AHA1-AHA11*) descritas em *Arabidopsis* (Palmgren et al., 2001; Gaxiola et al., 2007). A função celular de tantas isoformas distintas ainda não está clara. Entretanto, sabe-se, por exemplo, que as isoformas *AHA1* e *AHA2* são expressas praticamente em todos os tecidos e órgãos vegetais, enquanto outras isoformas, como *AHA6* e *AHA8* têm expressão específica nas anteras. Desta maneira, postula-se que determinadas situações durante a ontogênese vegetal requeiram isoformas específicas da P-ATPase para desempenhar funções específicas do tecido ou órgão em questão (Gaxiola et al., 2007).

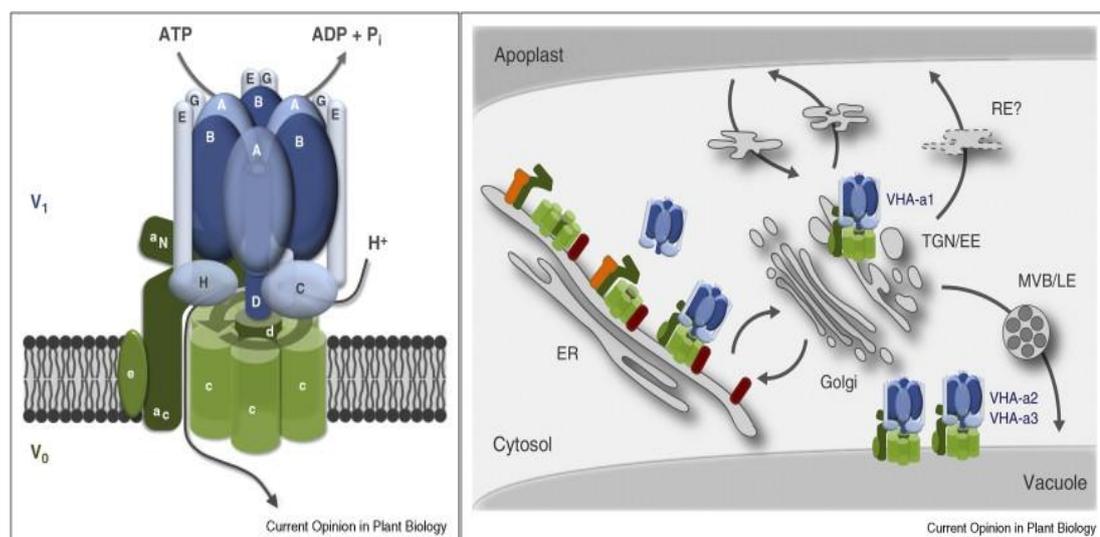


**Figura 1:** Modelo estrutural da  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática (Pedersen et al., 2007).

### 2.2.2. $H^+$ -ATPase tipo V

A  $H^+$ -ATPase tipo V (EC 3.6.1.3) é uma proteína de transporte ativo localizada no tonoplasto (TN) e em vários outros componentes dos sistemas de endomembranas das células vegetais (Sze et al., 1992; Lüttge e Ratajczak, 1997)

(Figura 2). Esta enzima consiste de várias subunidades polipeptídicas, as quais estão localizadas em dois domínios distintos: um canal de prótons transmembrânico ( $V_0$ ) e um complexo catalítico ( $V_1$ ). O domínio  $V_0$  hidrofóbico, de aproximadamente 260 kDa, é constituído de seis subunidades (a, d, e, c, c', c'') que são proteínas integrais de membrana, juntas formam um canal protônico (Forgac, 1999). As subunidades a, c, c', c'', d e e do complexo  $V_0$  apresentam massa molecular aparente de 100, 16, 17, 19-23 e 36-38 kDa, respectivamente (Graham et al., 2000). O complexo  $V_1$ , catalítico, é um domínio periférico de 570 kDa composto por oito subunidades (A-H), responsáveis por hidrolisar o ATP (Forgac, 1999; Zhang et al., 2008). Este complexo é composto das subunidades A e B da cabeça que possuem massa molecular de 67-73 kDa e 55-60 kDa, respectivamente, e das subunidades do talo C (40-45 kDa), D (32-33 kDa), E (28-33 kDa), F (13-14 kDa), G (12-16 kDa), H (51-54 kDa) (Figura 2).



**Figura 2:** Representação esquemática da V-ATPase e sua localização no sistema de endomembranas (Schumacher e Krebs, 2010).

Esta é a enzima mais antiga e complexa dentre as três bombas de  $H^+$ , compartilhando características semelhantes à sua ancestral F-ATPase (Nishi e Forgac, 2003; Gaxiola et al., 2007). Na membrana vacuolar é a enzima mais abundante, compondo de 6,5 a 35% do total das proteínas presentes, em diferentes espécies de plantas (Klink et al., 1990). Em condições de estresse

ambiental, a V-ATPase pode sofrer pequenas mudanças na expressão de suas subunidades e na modulação de sua estrutura (Lüttge et al., 1995). Alguns estudos demonstraram que dependendo do estágio de desenvolvimento da planta e das condições ambientais a que é submetida, é possível que aconteçam modificações na quantidade, na atividade e na composição de suas subunidades (Lüttge et al., 1997). Outros estudos mostram um incremento na quantidade de todas as subunidades desta enzima, para algumas espécies vegetais, quando em condições de estresse salino (Narasimhan et al., 1991).

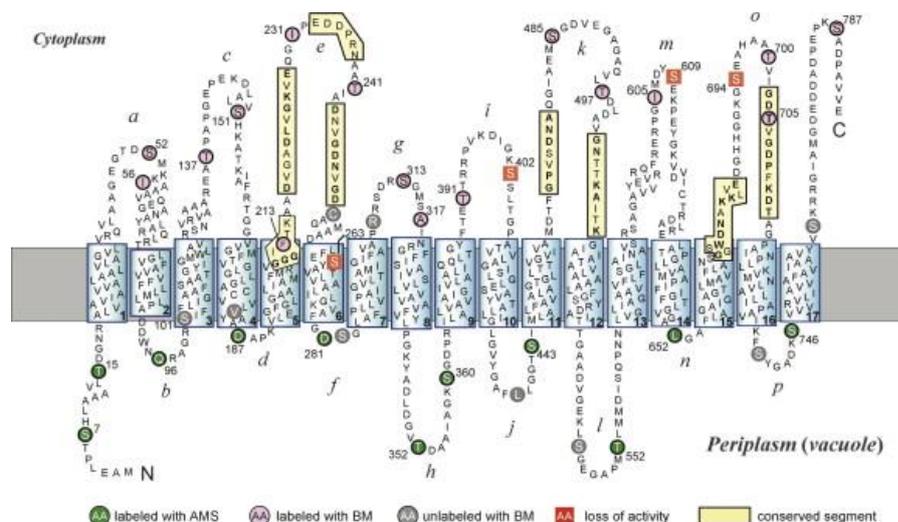
A redução da expressão da subunidade C (domínio  $V_1$ ) da V-ATPase no mutante *det3* de *Arabidopsis* pode gerar plantas anãs com expansão celular reduzida (Schumacher et al., 1999). A superexpressão das subunidades c1 e c3 do setor transmembrânico ( $V_0$ ) também foi evidenciada como fundamental para a expansão celular em raízes e para tolerância moderada ao estresse salino (Padmanaban et al., 2004). Além da função clássica atribuída a esta enzima, é provável que a mesma participe na sinalização de açúcares por meio da subunidade B1 (Cho et al., 2006). Dada a sua participação no tráfego de membranas, digestão endocítica, entre outros processos, o papel da V-ATPase sobre a fisiologia vegetal pode ser ainda mais complexo (Beyenbach e Wiczorek, 2006).

### 2.2.3. $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase

Uma característica própria de plantas é a existência de bombas de  $H^+$  alternativas que usam nucleotídeos ou pirofosfato (PP<sub>i</sub>) como fontes alternativas de energia. Uma delas é a  $H^+$ -pirofosfatase ( $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase) (EC 3.6.1.1) que tem sido encontrada em todas as plantas, em algumas bactérias fototróficas (Nyrén et al. 1991; Baltscheffsky et al., 1999) e protozoários (Scott et al., 1998; Maeshima, 2000). A  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase consiste de um único polipeptídeo com massa molecular aproximada de 80 kDa, altamente hidrofóbico, consistindo de 14 a 17 domínios transmembranares  $\alpha$ -hélice (Figura 3).

Existem dois tipos de  $H^+$ -pirofosfatase filogeneticamente distintos: a  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase do tipo 1, a qual é dependente de  $K^+$  do citosol para a sua atividade e possui moderada inibição pela presença de  $Ca^{2+}$  e; a  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase do tipo 2, a qual é

insensível a  $K^+$ , mas extremamente sensível a  $Ca^{2+}$  (Maeshima, 2000; Gaxiola et al., 2007). A pirofosfatase foi originalmente descrita como um complexo enzimático transportador de  $H^+$  característico da membrana vacuolar (Rea e Sanders, 1987; Rea e Poole, 1993). Além do vacúolo, a  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase já foi localizada no complexo de Golgi (Mitsuda et al., 2001). Outros estudos identificaram a atividade desta enzima em frações enriquecidas de membrana plasmática obtida por centrifugação pelo método de gradiente de sacarose (Petel e Gendraud, 1989; Macri e Vianello, 1990) e por partição de fase (Williams et al., 1990). Estas observações foram inicialmente interpretadas como uma contaminação da fração de membrana plasmática por vesículas de tonoplasto. Entretanto, técnicas utilizando imunocitoquímica e imunoblotting têm promovido evidências diretas para a presença da  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase na membrana plasmática de alguns organismos, como por exemplo, na membrana plasmática de células do floema de *Ricinus communis* (Long et al., 1995), em cotilédones de ervilha em desenvolvimento (Robinson et al., 1996), em células de tabaco BY-2 cultivadas em suspensão (Sikora et al., 1998), na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Robinson et al. 1998) e nas células companheiras de *Arabidopsis thaliana* (Paez-Valencia et al., 2011). Embora existam muitas evidências que mostram que a localização desta enzima não está restrita ao tonoplasto de alguns tipos celulares, sua função na membrana plasmática ainda não foi esclarecida (Stitt, 1998).



**Figura 3:** Modelo da  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase de *Streptomyces coelicolor* (Gaxiola et al., 2007).

A H<sup>+</sup>-pirofosfatase é a principal bomba de prótons vacuolar na maioria dos tecidos jovens. Em células maduras, a atividade metabólica diminui e o pirofosfato (PP<sub>i</sub>) pode não mais estar disponível em grandes quantidades, além disso, a taxa de transporte de solutos para dentro do vacúolo também decresce e a expansão dos vacúolos cessa. Esta enzima tem um papel vital no metabolismo energético, pois o (PP<sub>i</sub>) é um subproduto natural de várias reações biossintéticas (Cooperman et al., 1992). A hidrólise de PP<sub>i</sub>, por H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ases, favorece estas polimerizações biossintéticas ao diminuir a concentração citoplasmática deste produto.

Além da acidificação vacuolar, estudos recentes têm demonstrado um novo papel para H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase como uma enzima recicladora de PP<sub>i</sub> citosólico. Ferjani et al. (2011) utilizando o mutante de *Arabidopsis fugu 5*, que não possui atividade de hidrólise de PP<sub>i</sub> mostraram que o nível elevado deste substrato no citoplasma inibe a gliconeogênese e induz um fenótipo alterado nestes mutantes. No entanto, a adição de sacarose ao meio de crescimento e expressão do gene *IPP1* da H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase citosólica de levedura, que hidrolisa o PP<sub>i</sub>, mas não tem efeito sobre a acidificação vacuolar, proporcionaram a recuperação do fenótipo normal nestes mutantes. Com base nestes resultados, os autores mostraram um importante papel desta enzima para remoção do PP<sub>i</sub> citosólico durante os estágios iniciais de desenvolvimento vegetal (Ferjani et al., 2011; 2012).

### 3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Baltscheffsky, M., Schultz, A., Baltscheffsky, H. (1999) H<sup>+</sup>-PPases: a tightly membrane-bound family. *FEBS Letters* 457: 527-533.
- Beyenbach, K.W., Wieczorek, H. (2006) The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.* 209: 577-589.
- Briskin, D.P., Reynolds-Niesman, I. (1989) Change in target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase during solubilization and reconstitution. *Plant Physiol.* 90: 394-397.
- Cho, Y.H., Yoo, S.D., Sheen, J. (2006) Regulatory functions of Nuclear Hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell* 127: 579-589.
- Cooperman, B.S., Baykov, A.A., Lahti, R. (1992) Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends Bioch. Sci* 17: 262-266.
- Duby, G., Boutry, M. (2009) The plant plasma membrane próton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflugers Arch.* 457(3): 645-655.
- Empresa de pesquisa energética. Potencial de redução de emissões de CO<sub>2</sub> em projetos de produção e uso de biocombustíveis. Brasília, 2007.
- Ferjani, A., Segami, G., Horiguchi, G., Muto, Y., Maeshima, M., Tsukaya, H. (2011) Keep and eye on PP<sub>i</sub>: The vacuolar-type H<sup>+</sup>-pyrophosphatase

- regulates postgerminative development in Arabidopsis. *The Plant Cell*: 23: 2895-2908.
- Ferjani, A., Segami, G., Horiguchi, G., Sakata, A., Maeshima, M., Tsukaya, H. (2012) Regulation of pyrophosphatase levels by H<sup>+</sup>-PPase is central for proper resumption of early plant development. *Plant Signal. Behav.* 7: 38-42.
- Forgac, M. (1999) The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase of clathrin-coated vesicles is reversibly inhibited by S-nitrosoglutathione. *J. Biol. Chem.* 274 (3): 1301-1305.
- Fuglsang, A.T., Visconti, S., Drumm, K., Jahn, T., Stensballe, A., Mattei, B., Jensen, O.N., Aducci, P., Palmgren, M.G. (1999) Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr946-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr947. *J Biol Chem* 274(51): 36774-36780.
- Graham, L.A., Powel, B., Stevens, T.H. (2000) Composition and assembly of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase complex. *J. Exp. Biol.* 203: 61-70.
- Kanczewska, J., Marco, S., Vandermeeren, C., Maudoux, O., Rigaud, J., Boutry, M. (2005) Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins convert a dimer into a hexamer. *PNAS* 102(33): 11675-11680.
- Klink, R., Haschke, H.P., Kramer, D., Liittge, U. (1990) Membrane particles, proteins and ATPase activity of tonoplast vesicles of *Mesembryanthemum crystallinum* in the C3 and CAM state. *Botanica Ada* 103: 24-31.
- Kluge, R.A. (2003) Fotossíntese. São Paulo, SP. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiro.
- Leigh, R.A., Pope, A.J., Jennings, I.R., Sanders, D. (1992) Kinetics of the vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. The roles of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates, activators, and inhibitors. *Plant Physiol.* 100: 1698-1705.
- Lima, A.M.S. (2009) Biocombustíveis: Paradigma da energia limpa ou novo modelo de expropriação do campo e destruição dos biomas brasileiros.

Anais do 12º Encontro de Geógrafos de América Latina. Montevideu – Uruguai.

- Logan, H., Basset, M., Very, A.A., Setenac, H. (1997) Plasma membrane transport systems in higher plants: From black boxes to molecular physiology. *Plant Physiol.* 100: 1-15.
- Long, A.R., Williams, L.E., Nelson, S.J., Hall, J.L. (1995) Localization of membrane pyrophosphatase activity in *Ricinus communis* seedlings. *J. Plant Physiol.* 146: 629-638.
- Lüttge, U., Ratajczak, R., Rausch, T., Rockel, B. (1995) Stress responses of tonoplast proteins: an example for molecular ecophysiology and the search for eco-enzymes. *Acta Bot Neerl* 44: 343-362.
- Lüttge, U., Ratajczak, R. (1997) The physiology, biochemistry and molecular biology of the plant vacuolar ATPase. in *The Plant Vacuole: Adv. Bot. Research* eds Leigh, R. A.; Sanders, D. (Academic Press, Oxford) 25: 253-296.
- Lv, S., Zhang, K., Gao, Q., Lian, L., Song, Y., Zhang, J.R. (2008) Overexpression of an H<sup>+</sup>-PPase from *Thellungiella halophila* in cotton enhances salt tolerance and improves growth and photosynthetic performance. *Plant Cell Physiol.* 49: 1150-1164.
- Macri, F., Vianello, A. (1990) Proton pumping pyrophosphatase in a high density fraction of radish microsomes. *Plant Cell Physiol.* 31(2): 261-266.
- Maeshima, M. (2000) Vacuolar H<sup>+</sup>- pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta* 1465: 37-51.
- Mitsuda, N., Enami, K., Nakata, M., Takeyasu, K., Sato, M.H. (2001) Novel type *Arabidopsis thaliana* H<sup>+</sup>-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* 488: 29-33.
- Moreira, H.M., Giometti, A.B.R. (2008) O Protocolo de Quioto e as possibilidades de inserção do Brasil no Mecanismo de Desenvolvimento Limpo por meio de projetos em energia limpa. *Rev. Cont. Internac.*, Rio de Janeiro 30 (1): 9-47.

- Nakanishi, H.U., Maeshima, M. (1998) Quantification of  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  Antiporter VCAX1p in Vacuolar Membranes and Its Absence in Roots of Mung Bean. *Plant Cell Physiol.* 41(9): 1067-1071.
- Narasimhan, M.L., Binzel, M.L., Perez-Prat, E., Chen, Z., Nelsen, D.E., Singh, N.K., Bressan, R.B., Hasegawa, P.M. (1991) NaCl regulation of tonoplast ATPase 70-kilo-dalton subunit mRNA in tobacco cells. *Plant Physiol.* 97: 562-568.
- Nishi, T., Forgac, M. (2002) The vacuolar ( $\text{H}^{+}$ )-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat. Mol. Cell Biol.* 3(2): 94-103.
- Nyrén, P., Nore, B.F., Strid, A. (1991) Proton-pumping N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: purification, characterization, and reconstitution. *Biochem.* 30: 2883-2887.
- Padmanaban, S., Lin, X., Perera, I., Kawamura, Y., Sze, H. (2004) Differential expression of vacuolar  $\text{H}^{+}$ -ATPase subunit c genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi. *Plant Physiol.* 134: 1514-1526.
- Paez-Valencia, J., Patron-Soberano, A., Rodriguez-Leviz, A., Sanchez-Lares, J., Sanchez-Gomez, C., Valencia-Mayoral, P., Diaz-Rosas, G., Gaxiola, R. (2011) Plasma membrane localization of the type I  $\text{H}^{+}$ -PPase AVP1 in sieve element-companion cell complexes from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 181: 23-30.
- Palmgren, M.G. (2001) Plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52: 817-845.
- Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., Chen, J., Qiu, X., Zhu, L., Zhang, X., Auld, D., Blumwald, E., Zhang, H., Gaxiola, R., Pavton, P. (2011) Expression of Arabidopsis vacuolar  $\text{H}^{+}$ -pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the Field conditions. *Plant Biotechnol. J.* 9: 88-99.

- Pedersen, B.P.; Buch-Pedersen, M.J.; Morth, J.P.; Palmgren, M.G.; Nissen, P. (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* 450 (7172): 1111-1114.
- Petel, G., Gendraud, M. ((1987) Activite d'un systeme oxydoreducteur au niveau Du plasmalemmes des cellules de parenchyme de Topinambour (*Helianthus tuberosus* L.) en relation avec les proprietes morphogenetiques des tubercules. *Compte rendu de l'Academie des Sciences, Paris* 305: 51-54.
- Rea, P.A., Poole, R. (1993) Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol* 44: 157-180.
- Rea, P.A., Sanders, D. (1987) Tonoplast energization: two H<sup>+</sup> pumps, one membrane. *Physiol Plant* 71: 131-141.
- Ricklefs, R. (2009) *A economia da natureza*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Robinson, D.G., Haschke, H.P., Hinz, G., Hoh, B., Maeshima, M., Marty, F. (1996) Immunological detection of tonoplast polypeptides in the plasma membrane of pea cotyledons. *Planta* 198: 95-103.
- Robinson, D.G., Hoppenrath, M., Oberbeck, K., Luykx, P., Ratajczak, R. (1998) Localization of pyrophosphatase and V-ATPase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bot. Acta* 111: 108-122.
- Sanders, D., Bethke, P. (2000) Membrane transport. In: Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. *ASPP. Rockville*, 110-158.
- Scott, D.A., Souza, W., Benchimol, M., Zhong, L., Lu, H.G., Noreno, S.N.J., Docampo, R. (1998) Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 273: 22151-22158.
- Schumacher, K., Vafeados, D., McCarthy, M., Sze, H., Wilkins, T., Chory, J. (1999) The Arabidopsis det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase in plant growth and development. *Genes Dev.* 13: 3259-3270.
- Schumacher, K.; Krebs, M. The V-ATPase: small cargo, large effects. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 724-730, 2010.

- Sikora, A., Hillmer, S., Robinson, D.G. (1998) Sucrose starvation causes a loss of immunologically detectable pyrophosphatase and V-ATPase in the tonoplast of suspension-cultured tobacco cells. *J Plant Physiol.* 152: 207-212.
- Stitt, M. (1998) Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Bot. Acta* 111: 167-175.
- Sze, H., Ward, J.M., Lai, S. (1992) Vacuolar H<sup>+</sup>- translocating ATPases from plants: structure, function, and isoforms. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24:371-381.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2004) *Plant physiology*. 3.ed. Porto Alegre: ARTMED.
- Williams, L.E., Nelson, S.J., Hall, J.L. (1990) Characterization of solute transport in plasma membrane vesicles isolated from cotyledons of *Ricinus communis* L. - II. Evidence for a proton-coupled mechanism for sucrose and amino acid uptake. *Planta* 182: 532-539.
- Zhang, J., Ma, H., Feng, J., Zeng, L., Wang, Z., Chen, S. (2008) Grape berry plasma membrane proteome analysis and its differential expression during ripening. *J. Exp. Bot.* 59(11): 2979-2990.

#### **4. CAPÍTULO 1**

### **CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS BOMBAS DE H<sup>+</sup> PARA O DESENVOLVIMENTO DE GERMOPLASMAS DE CANA-DE-AÇÚCAR MAIS EFICIENTES NA PRODUÇÃO DE BIOENERGIA**

#### **RESUMO**

A cana-de-açúcar produz grandes quantidades de biomassa e acumula até 60% de sua matéria seca em sacarose. Tal capacidade implica em uma peculiar eficiência do metabolismo energético celular, ainda pouco explorado nesta espécie. As bombas de prótons presentes nas membranas plasmática e vacuolar mobilizam grande parte da energia celular dirigindo a captação, o transporte e o acúmulo de nutrientes, incluindo a translocação e compartimentalização de fotoassimilados. Neste trabalho avaliou-se os sistemas de transdução de energia das membranas de células do colmo jovem (2 meses) e maduro (12 meses) testando a hipótese da correlação entre a modulação diferencial destes sistemas e a capacidade de acumulação de açúcares e biomassa expressa em genótipos de cana-de-açúcar com distintos potenciais produtivos. Para tanto foram

escolhidos o genótipo selvagem, *S. spontaneum*, que apresenta baixo conteúdo de sacarose e elevada produção de fibras, e dois híbridos interespecíficos, que acumulam elevado conteúdo de sacarose, RB758540 e RB855536. Aos 2 meses de idade a atividade das bombas de  $H^+$  no colmo dos híbridos interespecíficos foi maior que a observada na *S. spontaneum*. Esta ativação foi acompanhada por incrementos na produtividade destes híbridos, relacionados com uma maior taxa fotossintética, matéria fresca, diâmetro do colmo e número de feixes vasculares. Nos tecidos adultos também foi observado ativações das  $H^+$ -ATPases e das  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ases nos híbridos interespecíficos, além disso, entre os tecidos estudados, a casca apresentou maior atividade quando comparadas ao colmo. Por outro lado, os resultados mostraram uma maior eficiência no acoplamento das bombas de  $H^+$  nos tecidos internos onde ocorre o armazenamento de sacarose. Estes resultados em conjunto apontam para uma relação entre a eficiência destes sistemas transdutores de energia e a capacidade da cana-de-açúcar em acumular altas concentrações de sacarose em seus tecidos, sobretudo nos genótipos superiores. Tais resultados fornecem elementos importantes para o entendimento das bases bioquímicas e celulares da incomum acumulação de açúcares apresentada pela cana-de-açúcar, e constituem uma nova linha de ação para a seleção de marcadores bioquímicos de genótipos mais produtivos, capazes de guiar futuros programas de hibridização por *design* e/ou transgenia da cana.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

A importância da cana-de-açúcar para economia local e mundial é indiscutível e a sua crescente utilização no setor de biocombustíveis torna estratégico para o país o estudo das bases bioenergéticas desta cultura. Esta espécie tem sido cultivada e comercializada em cerca de 60 países, distribuídos em cinco continentes (Ali et al. 2007). Dentre estes, o Brasil se destaca como o principal produtor de cana-de-açúcar, com uma área de mais de oito milhões de hectares, produzindo mais de quinhentos e oitenta milhões de toneladas destinados à atividade sucroalcooleira (safra de 2012/2013) (CONAB, Abril de 2013).

A cana-de-açúcar é a principal fonte de sacarose do mundo e responde por mais de 70% da produção global (McCormick et al. 2008). Um colmo de cana maduro pode acumular de 12 a 16% de sacarose (peso de matéria fresca) e cerca de 60% de peso de matéria seca (Bull e Glasziou, 1963). O aumento no rendimento de sacarose da cana-de-açúcar pode ser proveniente do aumento da biomassa total ou aumento da concentração de sacarose no colmo. Este último é mais eficiente e lucrativo, já que diminuem os custos com colheita, transporte e moagem (Lakshmanan et al. 2005). Entretanto, variedades de cana melhoradas recentemente têm apresentado maiores rendimentos a partir do incremento da

biomassa, em vez de aumento do conteúdo de sacarose nos colmos (Jackson, 2005).

O aumento na produção de cana, decorrente da crescente demanda por seus derivados, implica na necessidade de obter variedades mais produtivas com relação a um maior acúmulo de sacarose. Atualmente buscam-se também variedades com aumento de matéria seca, uma vez que a produção de energia a partir da biomassa vegetal tem se destacado uma alternativa promissora no cenário mundial (Matsuoka et al. 2009). Isto tem despertado o interesse de muitos pesquisadores pelo estudo de marcadores bioquímicos e celulares para o melhoramento genético desta espécie (D'Hont e Glaszmann, 2001; Butterfield et al. 2001). Em nível celular a eficiência na produção de carboidratos, tanto para acúmulo de sacarose no colmo quanto para produção de biomassa, é dependente dos sistemas envolvidos no metabolismo energético desta espécie vegetal.

Muitas enzimas importantes fazem parte do metabolismo energético, entretanto, as bombas de  $H^+$  constituem os principais sistemas transdutores de energia das membranas celulares vegetais e fúngicas. As  $H^+$ -ATPases do tipo P e V, e as  $H^+$ -pirofosfatases de membrana ( $H^+$ -PP<sub>i</sub>ases), são os principais sistemas consumidores da energia metabólica celular. Estes últimos acoplam a hidrólise dos principais compostos fosfatados que retêm a maior parte da energia metabólica da célula (ATP e PP<sub>i</sub>) à geração de uma força próton-motora que energiza os transportadores secundários (Sze et al. 1999) estando portanto, diretamente relacionados ao acúmulo e à remobilização de solutos como no caso da sacarose em colmos de cana-de-açúcar. Neste contexto, investigou-se a hipótese de que a eficiência no acúmulo de açúcares e de biomassa na cana-de-açúcar esteja diretamente relacionada a uma modulação diferencial das bombas de  $H^+$ .

Ainda há poucos estudos relacionando as bombas de  $H^+$  ao acúmulo de açúcares ou produção de biomassa em cana-de-açúcar. Com base nisto, buscou-se uma caracterização holística da energética desta espécie avaliando desde indicadores do acúmulo de açúcares até análises bioquímicas dos principais sistemas de transdução de energia das membranas celulares (P- $H^+$ -ATPases, V- $H^+$ -ATPases e  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ases) em colmos de plantas jovens, e em diferentes tecidos

adultos, colmo e casca, de três genótipos de cana-de-açúcar que expressam distintas eficiências de produtividade. Com isto, também objetivou identificar padrões especificamente correlacionados com germoplasmas mais eficientes na acumulação de açúcar no colmo e com alta produtividade em campo.

## 4.2. REVISÃO DE LITERATURA

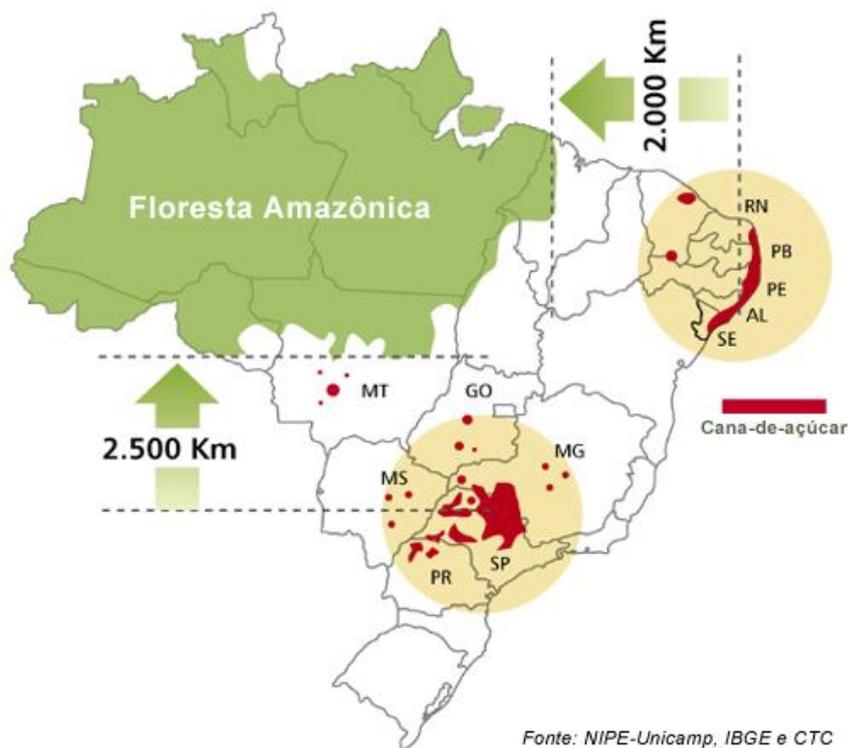
### 4.2.1. Importância da cana-de-açúcar para o Brasil

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea notável pela sua capacidade de estocar altas concentrações de sacarose no colmo. Seus derivados (açúcar e etanol) estão entre os principais produtos de exportação do Brasil, que atualmente é o líder mundial na produção da cana (Embrapa, 2010). Além disso, é um dos poucos países que produzem etanol a partir da cana-de-açúcar. Desta forma, o balanço entre a produção de etanol e o açúcar no Brasil, afeta imediatamente o preço internacional do destes produtos (Bolling e Suarez, 2001).

No Brasil, destacam-se duas regiões produtoras – o Centro-Sul e o Nordeste (Figura 4). A produção na região Centro-Sul é dominada pelo Estado de São Paulo, e na região Nordeste os principais produtores são os Estados de Pernambuco e Alagoas (Embrapa, 2010). No Estado do Rio de Janeiro a agroindústria açucareira é um segmento importante para o agronegócio, sendo responsável pela geração de empregos e renda (Veiga et al. 2006). Quando analisa a produção total de cana-de-açúcar do Estado, constata-se que a região Norte Fluminense é responsável por mais de 90% da produção de cana-de-açúcar do Rio de Janeiro, sendo o município de Campos dos Goytacazes responsável por mais de 50% dessa produção. Todavia, a baixa produtividade (55,6 t/ha) é um fator limitante para o crescimento do setor, tal condição poderia

ser revertida com a inserção de biotecnologias pertinentes que possam aumentar a produtividade aos níveis apresentados por São Paulo.

Os programas de melhoramento genético são responsáveis por grandes avanços na produtividade da cana-de-açúcar e pela capacidade de adaptação da cultura no ambiente. No Município de Campos dos Goytacazes foi realizado um dos mais importantes programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar pela Estação Experimental de Campos, conduzido por Frederico Menezes Veiga, considerado na época, o Pai da cana-de-açúcar do Brasil. Este programa gerou as variedades “CB” (Campos Brasil) que foram cultivadas em toda parte do Brasil. A CB 45-3 ocupava a maior área plantada nos Estados do Rio de Janeiro e Nordeste, e a CB 41-76 ocupava extensas áreas no Estado de São Paulo (www.consciencia.br).



**Figura 4:** Mapa das áreas onde se concentram as plantações e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade, segundo dados oficiais do IBGE, UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas – SP) e do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira).

Os atuais programas de melhoramento (CTC, RIDESA e EMBRAPA) vêm suprimindo a crescente produção de cana no Brasil através do desenvolvimento de variedades novas e mais produtivas. As atuais variedades comerciais de cana são híbridos resultantes de cruzamentos entre as espécies *Saccharum officinarum* L., *Saccharum spontaneum* L. e *Saccharum robustum*. Acessos de *S. officinarum* contribuíram com seu elevado teor de açúcar (cerca de 21%), pureza do caldo e baixo teor de fibra; enquanto os acessos de *S. spontaneum* e *S. robustum* caracterizam-se por ter baixos teores de açúcar (menos de 6 e 10%, respectivamente), mas apresentam maior resistência a doenças (Zhu et al. 1997). Novos cruzamentos entre variedades de cana-de-açúcar elite com a espécie selvagem *S. spontaneum* podem proporcionar um aumento no teor de fibras (Wang et al. 2008; Matsuoka et al. 2009).

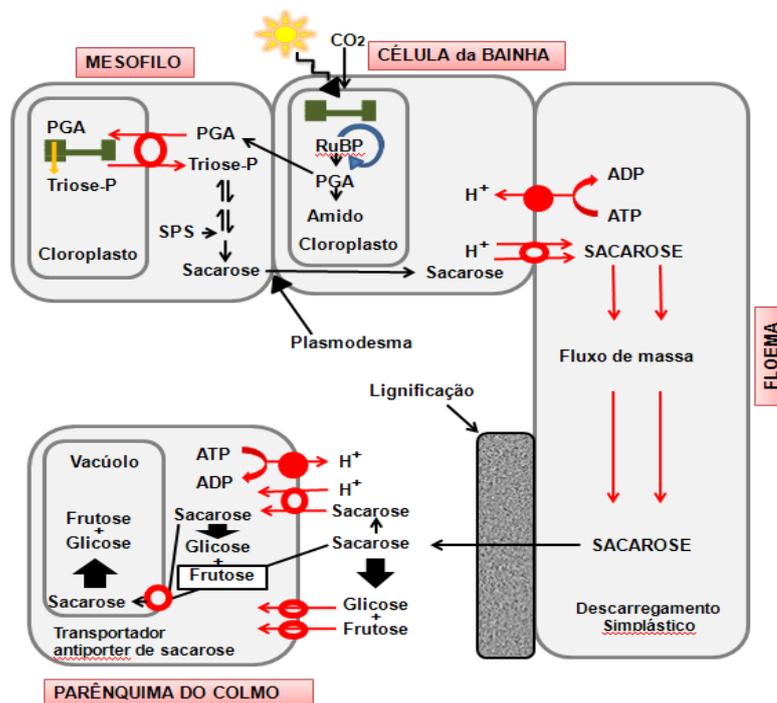
#### **4.2.2. Aspectos fisiológicos da cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar é uma cultura semiperene, e possui ciclo médio de 4 anos desde o plantio até a renovação das áreas plantadas. Segundo Paoliello (2006), a cana-de-açúcar faz parte da família Poacea do gênero *Saccharum*, tendo como principais espécies a *S. officinarum* L., a *S. spontaneum* L., *S. sinense* Roxb., *S. barberi* Jesw., *S. robustum* Jews e *S. edule* Hask. É comumente cultivada nas regiões tropicais e subtropicais, pois necessita de uma época quente e chuvosa para o desenvolvimento vegetativo, e uma época fria e/ou seca para o enriquecimento em açúcares (Grof e Campbell, 2001; Singh et al. 2008).

Esta cultura pertence ao grupo de plantas C4, que possuem elevada eficiência fotossintética na transformação de CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) em biomassa. Temperaturas adequadas juntamente com a grande quantidade de energia solar e de água forneceram um ambiente ideal para que a cana-de-açúcar se adaptasse no Brasil. Esta espécie caracteriza-se pelo seu potencial atípico para acumular uma elevada concentração de sacarose. Um colmo maduro pode acumular de 12 a 16% de sacarose (peso de matéria fresca) e cerca de 60% de peso de matéria seca (Bull e Glasziou, 1963). Além disso, a sacarose é armazenada nas células do parênquima do colmo e não em um órgão

especializado. Sugere-se que o acúmulo de sacarose seja regulado dentre vários fatores pela força dos órgãos dreno. Durante os estágios de crescimento e desenvolvimento, a cana atravessa dois períodos distintos com relação ao teor de açúcares. O primeiro é assinalado por um intenso crescimento vegetativo acompanhado por uma gradual produção de sacarose, usada para síntese de complexos carbonados (celulose e hemicelulose) (Rea et al. 2009). Enquanto, no segundo, ocorre um predominante acúmulo de sacarose nas células do parênquima em colmos maduros, motivado pela escassez dos principais fatores de desenvolvimento vegetativo, como temperatura e água disponível (Magalhães, 1987).

O transporte dos fotoassimilados dos órgãos fontes para os órgãos drenos envolve a passagem através da membrana plasmática e da parede celular, por meio de transportadores celulares dependentes da energia metabólica ou mesmo por transporte passivo. O carregamento de sacarose para as células companheiras do floema é realizado por um sistema de co-transporte com íons hidrogênio. Uma vez dentro das células companheiras, a transferência da sacarose para os tubos do floema é feita, de maneira preferencial, através dos plasmodesmos, a favor de um gradiente de concentração. No floema, a sacarose se movimenta por fluxo de massa, até atingir a célula dreno, onde sofre descarregamento ativo para o interior do vacúolo de uma célula do parênquima no colmo. O processo de armazenamento inclui a inversão da sacarose, interconversão, fosforilação de glicose e frutose, síntese de sacarose fosfato e acúmulo ativo através do tonoplasto. Uma característica importante deste processo é que a sacarose é movida contra um massivo gradiente de concentração. Para sair do vacúolo, a sacarose deve ser quebrada novamente em frutose e glicose (Taiz e Zeiger 2004) (Figura 5).



**Figura 5:** Vias de movimentação de açúcares em cana-de-açúcar (A). Adaptado de Chiou e Bush (1996)

O metabolismo de sacarose envolve muitas enzimas que atuam no processo de síntese e transporte deste açúcar, até o momento, pouco se sabe a respeito de quais enzimas seriam importantes alvos de controle para otimizar a acumulação de sacarose na cana-de-açúcar. Neste caso, há necessidade de melhor entendimento sobre o sistema de síntese, transporte e de acúmulo dos metabólicos nesta espécie.

#### 4.2.3. Enzimas do metabolismo de açúcares

A acumulação de sacarose nos tecidos de armazenamento é acompanhada por contínuas reações de clivagem e síntese deste dissacarídeo (Whittaker e Botha 1997). Essas reações são catalisadas por várias enzimas diferentes que operam em paralelo (Quick e Schaffer, 1996). As principais enzimas envolvidas diretamente no metabolismo da sacarose são: sacarose fosfato sintase (SPS), sacarose sintase (SS), invertase ácida solúvel (IAS), invertase neutra (IN) (Komor, 2000). SPS catalisa a reação de síntese de sacarose 6-fosfato, a partir dos monossacarídeos UDP-glicose e frutose 6-fosfato.

Já a SS além de sintetizar sacarose, pode realizar a reação inversa de hidrólise desse açúcar juntamente com as invertases. Os primeiros genes da SPS clonados foram de milho (Worrell et al. 1991) e espinafre (Klein et al. 1993). Subsequentemente, genes da SPS foram clonados de mais de 20 outras espécies vegetais, principalmente dicotiledôneas e cianobactérias (Lunn e MacRae, 2003).

As gramíneas contêm quatro famílias de genes da SPS, correspondendo às famílias A, B e C em dicotiledôneas, mais a nova família D, contendo duas subfamílias de genes (D1 e D2). A família D parece ser restrita a gramíneas (Castleden et al. 2004). Estudos realizados por Grof et al. (2006) mostram que a família A é fracamente expressa nas folhas da cana e fortemente expressa no colmo. Já, na família B, ocorre o inverso. Em relação à família C, sua expressão se destaca nas folhas velhas, enquanto as subfamílias D1 e D2 são marcadamente expressas no colmo.

As invertases quebram a sacarose em hexoses e, assim, disponibilizam as células carbono e energia para o processo de respiração, bem como energia para a síntese de numerosos compostos diferenciados (assim como os carboidratos complexos para síntese de fibras). Estas enzimas podem estar envolvidas no transporte de sacarose a longas distâncias por criar um gradiente de concentração de sacarose entre os sítios de carregamento e descarregamento do floema, revelando função fundamental na partição dos fotoassimilados entre armazenamento e crescimento (Eschrich, 1980). Diferentes isoenzimas da invertase podem ser distinguidas com base em sua localização intracelular, ponto isoelétrico e pH ótimo. A invertase ácida solúvel (IAS) é encontrada no apoplasto e nos vacúolos de entrenós jovens, mas está ausente nos tecidos maduros; a invertase ácida (IA) é encontrada na parede celular de tecidos de todas as idades; e a invertase neutra (IN) é encontrada em baixas concentrações no citoplasma de tecidos jovens e em altas concentrações em tecidos maduros (Gutiérrez-Miceli et al. 2005).

O desenvolvimento do entrenó da cana-de-açúcar passa por três grandes fases, que são parcialmente controladas pela atividade das enzimas do metabolismo de sacarose. Em cada fase, há um fluxo de sacarose que é dividido entre utilização e estocagem. A primeira fase é chamada de alongação. Nesta

fase, parte do assimilado é usado para construir a estrutura do entrenó, e a taxa de síntese é expressivamente maior que sua utilização. Ocorrem picos de atividade da invertase ácida e da SS. Os açúcares começam a acumular-se, embora mais de 80% sejam glicose e frutose, e não sacarose. A taxa de alongação é diretamente correlacionada com a atividade da invertase ácida e inversamente correlacionada com a atividade da SPS. Na segunda fase, ocorre acumulação de peso da matéria-seca. Este estágio é acompanhado por baixa atividade da invertase ácida e da SS, e por altas taxas da invertase neutra e da SPS. Na última fase, o peso da matéria-seca do entrenó é mantido. O transporte de assimilado para dentro do entrenó deve ser, aproximadamente, igual ao consumido ou remobilizado para outros órgãos. Nenhuma mudança na atividade enzimática foi observada durante a transição do entrenó, da fase de acumulação para a de manutenção (Lingle, 1999).

#### **4.2.4. Bombas de H<sup>+</sup> e sua relação com a produtividade**

Sacarose e aminoácidos são acumulados no floema, via processos de co-transporte de H<sup>+</sup>, energizado pela força próton-motora, resultante da atividade das bombas de H<sup>+</sup> dos tecidos vasculares. A diferença de potencial eletroquímico, gerado pela H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática, é a força motora usada no transporte ativo de nutrientes. Além disto, esta enzima participa de outras funções essenciais ao crescimento da planta, tais como tolerância à salinidade e regulação do pH intracelular (Palmgren, 1991; Morsomme e Boutry, 2000; Sondergaard et al. 2004).

Na cana-de-açúcar, grande parte da sacarose é estocada no vacúolo. Portanto, uma considerável quantidade de energia deve ser gasta para manter a troca dinâmica de metabólitos entre o vacúolo e o citoplasma. As duas enzimas que diretamente traduzem a energia para o transporte no tonoplasto são a V-H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase. A maior parte do sabor das frutas e dos vegetais é devido a compostos estocados no vacúolo. Quando necessários esses metabólitos primários podem ser recuperados dos vacúolos e utilizados em rotas específicas (Taiz e Zeiger, 2004). Além da acumulação e estocagem de metabólitos, os vacúolos participam da regulação da homeostase citosólica,

compartimentalização de substâncias tóxicas, reciclagem de componentes celulares e crescimento celular (Maeshima et al. 1996). Nos tecidos do entrenó maduro de cana-de-açúcar, a  $H^+$ -ATPase vacuolar é expressa, concomitantemente, com o desenvolvimento do vacúolo, e está presente nas células do parênquima de preenchimento (Rae et al. 2008).

Alguns trabalhos recentes demonstraram que a superexpressão de genes que codificam as bombas de  $H^+$  pode representar uma importante estratégia para o aumento na produtividade de várias espécies. A superexpressão do gene *AVP1* que codifica a  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase tem sido relacionada a regulação do transporte de auxina, a promoção do desenvolvimento radicular, organogênese e a tolerância a estresses abióticos (Li et al. 2005). Neste trabalho também foi relatado que esta transgenia induziu a superexpressão da  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática. Mais recentemente, Pasapula et al. (2010) mostraram que a superexpressão do gene *AVP1*, além de aumentar a resistência a estresses hídrico e salino, também aumentou a produção de fibras em algodão em condições de campo.

### 4.3. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a energética celular de genótipos de cana-de-açúcar com características distintas de acumulação de açúcares, com o intuito de identificar marcadores fisiológicos e moleculares de genótipos energeticamente mais produtivos e eficientes na produção de bioenergia.

#### 4.3.3. Objetivos específicos

- Verificar diferenças na capacidade fotossintética, na morfologia e na anatomia de genótipos de cana-de-açúcar, ainda, em estágio inicial de desenvolvimento (plântulas) e relacioná-las com um maior potencial para produção de bioenergia;

- Determinar o teor de açúcares e a atividade das principais enzimas do metabolismo de sacarose (SPS e IAV) em colmos de dois híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar e compará-lo com a espécie parental, *S. spontaneum*, para avaliar as características que as distinguem umas das outras no que tange aos respectivos potenciais para acumulação de açúcares já nos estágios iniciais de desenvolvimento;

- Mensurar as atividades hidrolíticas e de transporte de  $H^+$  das  $H^+$ -ATPases tipo P e V e das  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ases no colmo jovem da *S. spontaneum* e dos híbridos interespecíficos, bem como nos tecidos do colmo e da casca de plantas adultas, para verificar a relação entre o acúmulo de açúcar e/ou de biomassa, com uma possível ativação diferencial destas enzimas nos germoplasmas com diferentes potenciais para produção de bioenergia;

- Analisar a regulação da expressão funcional das bombas de  $H^+$  nos genótipos híbridos e na espécie parental, para verificar a hipótese de a modulação destas enzimas estar diretamente relacionada à eficiência de síntese e ao armazenamento de açúcares na cana.

## 4.4. METODOLOGIA

### 4.4.1. Material vegetal

Foram realizadas avaliações em três genótipos de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular açúcar e biomassa. Foi então selecionada como controle a espécie parental *S. spontaneum* caracterizada por apresentar um metabolismo rústico, um baixo acúmulo de sacarose, um alto teor de fibra e uma resistência a estresses bióticos e abióticos. Os híbridos interespecíficos com alto potencial para acumular sacarose, RB758540 e RB855536, foram selecionados para o presente estudo por terem se destacado em termos de potencial de produtividade em estudos preliminares.

Os experimentos foram realizados em duas etapas. Na primeira, minitoletes dos genótipos de cana-de-açúcar providos pela Estação Experimental da PESAGRO em Campos dos Goytacazes foram plantados em bandejas contendo substrato comercial PlantMax. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação, com temperatura e fotoperíodo ambientes, sendo irrigadas diariamente até as plantas atingirem dois meses de cultivo, quando foram coletadas para análises da capacidade fotossintética, da morfologia e anatomia, metabolismo dos açúcares e atividade das bombas de H<sup>+</sup>.

Para a segunda etapa, as plantas de cana-de-açúcar foram mantidas em condições de campo na PESAGRO. Aos doze meses de idade foram coletados

colmos inteiros e levados para o laboratório para o início imediato dos experimentos. Para análises bioquímicas foram separados os tecidos do colmo e da casca manualmente com auxílio de instrumentos cortantes. E em seguida estes dois tecidos foram usados para avaliar a atividade e expressão das bombas de H<sup>+</sup>.

#### **4.4.2. Emissão de fluorescência da clorofila a**

Para obtenção dos dados referentes à emissão de fluorescência da clorofila a foi utilizado um fluorímetro modulado portátil, modelo FMS2 (Hansatech, UK). As medidas foram feitas na superfície adaxial de 4 folhas intactas (totalmente expandidas e livres de necrose ou ferimentos) das duas variedades comerciais, RB758540 e RB855536. As análises não puderam ser realizadas na *S. spontaneum*, devido à limitação do equipamento em realizar leituras em folhas muito finas, como no caso deste genótipo.

O experimento se processou ao expor as folhas anteriormente adaptadas ao escuro (por 30 minutos), com o auxílio de pinças, a uma luz de medição (aproximadamente 6  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 660 nm), seguida pela exposição à luz actínica (luz branca) de alta intensidade (10.000  $\mu\text{mol}$   $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), aplicada por 0,8 segundos, seguindo a metodologia de Genty et al. (1989) e Van Kooten e Snel (1990). Em seguida os valores foram registrados e submetidos à análise da eficiência quântica potencial ( $F_v/F_m$ ). Esta análise foi importante para inferir sobre o estado fisiológico das plantas nas condições em que foram cultivadas.

#### **4.4.3. Teor relativo de conteúdo verde**

Para obtenção destes dados foi utilizado o medidor de clorofila portátil, modelo SPAD-502 (Minolta, Japan). Tal equipamento determina a intensidade de cor verde das folhas por meio de sensores, podendo viabilizar uma inferência sobre o teor de clorofila total. Foram analisadas 4 folhas intactas, obtendo-se uma leitura na parte central foliar.

#### 4.4.4. Trocas gasosas

Para as medidas de trocas gasosas foi utilizado um analisador de CO<sub>2</sub> no infravermelho IRGA portátil, de circuito aberto, modelo CIRAS-2 (Portable Photosynthesis Systems, Hitchin, Hertfordshire, UK - LCA). 4 folhas de cada genótipo foram clipeadas com o auxílio de uma cuveta Parkinson com 2,5 cm<sup>2</sup> de área foliar conectada ao CIRAS-2. Luz artificial saturante, umidade e concentração de CO<sub>2</sub> foram ajustadas para 2000 μmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de fótons, 80% e 375 ppm, respectivamente. Os seguintes parâmetros foram avaliados: taxa de transpiração (E: mmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>), condutância estomática (g<sub>s</sub>: mmol H<sub>2</sub>O m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>), carbono interno (C<sub>i</sub>: ppm) e taxa fotossintética (A: μmol CO<sub>2</sub> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>).

#### 4.4.5. Análises morfológicas

As plantas de cana-de-açúcar com dois meses de idade foram avaliadas morfológicamente quanto ao diâmetro e ao comprimento do colmo, com auxílio de um paquímetro digital. Plantas sem o sistema radicular foram pesadas em balança analítica para determinação da produtividade expressa pela matéria fresca dos três genótipos estudados.

#### 4.4.6. Análises anatômicas

Para as avaliações anatômicas, foram retirados colmos jovens dos três genótipos de cana-de-açúcar, e imersos em solução de floroglucinol acidificado (Johansen, 1940) por 60 minutos. O floroglucinol cora lignina. Posteriormente, foi contado o número de feixes vasculares, por meio de um estereomicroscópio. As mesmas amostras foram seccionadas transversalmente com lâminas de aço, e os cortes à mão livre foram montados em lâminas com água destilada. As observações foram realizadas por meio de um microscópio ótico Axioplan (Zeiss), acoplado a uma câmera fotográfica digital Canon Power Shot A640. A aquisição das imagens foi feita no programa Zoom Browser EX e as medições, no programa Image J (Abramoff et al. 2004). As variáveis analisadas foram as áreas ocupadas pelo parênquima de preenchimento, feixe vascular, esclerênquima, xilema e floema.

#### **4.4.7. Extração de açúcar total e determinação do teor de sacarose, glicose e frutose**

Para a extração de açúcares solúveis, macerou-se cerca de 0,1g de colmo de plantas de cana-de-açúcar com 2 meses de idade, com nitrogênio líquido e na presença de PVPP 10% p/v e 50 mM ácido ascórbico. Após obtenção de um pó fino, acrescentou-se 1 mL de etanol 80%. Levou os tubos ao banho-maria a 70<sup>0</sup>C por 90 minutos. Decorrido esse tempo, centrifugaram-se os tubos a 13000 rpm por 10 minutos a 4<sup>0</sup>C. Coletou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 1 mL de etanol 80%, centrifugando-se novamente a 13.000 rpm por 10 minutos a 4<sup>0</sup>C. Coletou-se o sobrenadante e juntou-o com o outro da centrifugação anterior, que foram congelados para posterior dosagem dos açúcares redutores e solúveis (Stitt et al. 1989).

A determinação de glicose, frutose e sacarose foi realizada por análise enzimática espectrofotométrica (Stitt et al. 1989) em função da redução do NAD<sup>+</sup> a 340 nm. Adicionaram-se, aos poços da placa, a amostra, a água e o tampão contendo: 100 mM de imidazole pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM NAD e 1 mM ATP. Para a quantificação da glicose, adicionaram-se 2U de G6PDH e 1,5U hexoquinase. Encerrada a reação, adicionaram-se, aos poços, 3U de fosfoglicose isomerase, para quantificação da frutose. Por fim, para determinação da sacarose, adicionaram-se 5U de β-fructosidase.

#### **4.4.8. Extração da sacarose fosfato sintase (SPS) e da invertase ácida vacuolar (IAV)**

A extração e a atividade enzimática foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Lingle (1999), com algumas modificações. Cerca de 1g de colmo jovem foi macerado com nitrogênio líquido, na presença de PVPP e ácido ascórbico, sendo a extração feita com tampão contendo: 50 mM de HEPES-KOH pH 7,5; 5 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mL L<sup>-1</sup> glicerol, 5 mM DTT; 0,5 gL<sup>-1</sup> Triton X-100 e 1 mM PMSF. O homogenato foi filtrado em “cheese-cloth” e, posteriormente, centrifugado a 4.500 x g a 4<sup>0</sup>C por 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante e congelou-o para posterior dessalinização. A dessalinização foi

realizada em 9 mL de uma coluna Sephadex G-25 com 25 mM de HEPES-KOH pH 7,5; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl<sub>2</sub> e 5 mM DTT.

#### **4.4.9. Atividade da sacarose fosfato sintase (SPS) e da invertase ácida vacuolar (IAV)**

Parte da amostra dessalinizada foi usada na atividade da sacarose fosfato sintase e da invertase. Para a atividade da SPS, incubou-se a amostra dessalinizada com tampão, contendo: 75 mM de HEPES-KOH pH 7,5; 3,75 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,75 mM EDTA; 2,25 mM UDP-glicose; 3 mM frutose 6 fosfato e 15 mM de glicose 6 fosfato. A amostra foi incubada com tampão a 34<sup>o</sup>C por 60 minutos. Para parar a reação, utilizaram-se 5,35 M KOH. Deixaram-se os tubos no gelo por um tempo e, depois, foram fervidos a 80<sup>o</sup>C por 10 minutos. Congelaram-se os tubos com nitrogênio líquido para dosagem da sacarose por antrona (Van Handel, 1968).

Para a atividade da invertase, o extrato enzimático foi misturado a 1M de acetato de sódio pH 4,5. Para iniciar a reação, foram adicionados 120 mM de sacarose. Deixaram-se os tubos em banho-maria a 37<sup>o</sup>C por 60 minutos. Para parar a reação, foram adicionados aos tubos, 2,5M de Tris-base e, em seguida, ferveram-se os tubos por 3 minutos. Os açúcares redutores foram dosados por DNS (Miller, 1959).

#### **4.4.10. Preparação da fração microsomal**

Aplicou-se uma preparação, em que se pode isolar de uma só vez, partindo-se de uma só amostra, as frações de vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto. Tais vesículas foram isoladas de colmos jovens e também dos tecidos adultos do colmo e da casca, através de centrifugação diferencial, como descrito por Giannini e Briskin (1987), com algumas alterações. Após serem pesadas as amostras de cada genótipo de cana-de-açúcar foram homogeneizados em meio tamponado, usando um liquidificador. O tampão de extração é composto de sacarose 250mm, glicerol a 10%, 5 mM de DTT, 5mM EDTA, 0,4% de PVP-40, 100 mM KCl, 0,3% BSA, PMSF 1 mM, Benzamidina 1

mM, Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM, na relação peso do tecido/volume de tampão de 1:2.

Toda manipulação foi realizada a uma temperatura de aproximadamente 4°C. O homogenato resultante foi então submetido à centrifugação a 1500 x g, durante quinze minutos para remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido à nova centrifugação, agora a 8.000 x g, por quinze minutos para remoção da fração mitocondrial. Em seguida o sobrenadante foi novamente centrifugado a 100.000 x g, por trinta minutos. O precipitado dessa centrifugação foi ressuspenso em solução tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,6) contendo glicerol a 10 %, DTT 5 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM, e EDTA 5 mM. Em seguida foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C até utilização.

#### **4.4.11 Determinação da atividade H<sup>+</sup>-ATPásica e H<sup>+</sup>-pirofosfatásica**

A atividade ATPásica e pirofosfatásica foi determinada colorimetricamente, segundo o método descrito por Fiske e Subbarrow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e finalizada com a adição de ácido tricloroacético em uma concentração final de 10 % (v/v) após 50 minutos de reação. Composição do meio de reação: Hepes-Tris pH 6,5 (para membrana plasmática) ou 7,0 (para membranas vacuolares), 50 mM; MgSO<sub>4</sub> 3 a 5 mM, KCl 100 mM, ATP 1 mM ou PP<sub>i</sub> 1 ou 0,5 mM e 0,03mg.ml<sup>-1</sup> de proteína. Foram utilizados também inibidores específicos, como o ortovanadato de sódio a 0,2 mM (inibidor da ATPase tipo P) e a concanamicina A a 5 nM (inibidor da ATPase tipo V). A hidrólise de PP<sub>i</sub> será aferida através de sua dependência por K<sup>+</sup>. A proteína total contida na preparação é dosada pelo método clássico descrito por Bradford (1976) - utilizando BSA como proteína padrão.

#### **4.4.12. Monitoramento do gradiente de H<sup>+</sup>**

O gradiente de prótons foi medido como descrito por Michelis e Spanswick (1986), com algumas modificações propostas por Façanha e de Meis (1998), monitorando a taxa de decréscimo da fluorescência ( $\Delta F/\text{min}$ ) da sonda fluorescente metacromática, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), excitada

com um feixe de comprimento de onda de 415 nm e a emissão captada a 485 nm, utilizando-se um espectrofluorímetro.

O ACMA contém um grupo amina que funciona como uma base fraca, e assumindo-se que quando não protonado tem capacidade de atravessar livremente a bicamada lipídica da membrana. A protonação da base do grupo amina limita essa capacidade de movimento transmembranar. Então a sonda distribui-se através da membrana em função da diferença de pH entre o interior e o exterior das vesículas. O meio reacional é composto de 10 mM de Tris pH 6.5 ou 7,0, KCl 100 mM, ACMA 1,3  $\mu$ M,  $MgSO_4$  1 ou 3 mM e ATP 3 mM ou PPI 0,4mM e 50  $\mu$ g de proteína. O gradiente é dissipado com  $NH_4Cl$  1,5 mM.

#### **4.4.13. Immunoblotting**

Para marcação com o anticorpo contra  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática foi realizado um dot blotting com mais amostras de cana-de-açúcar. Em um pedaço de membrana de nitrocelulose foram marcados quadrantes de  $1cm^2$ . Essa membrana de nitrocelulose foi embebida em tampão PBS (10 mM de  $Na_2HPO_4$ , pH 7,6 contendo 0,9% NaCl) por alguns minutos até que estivesse completamente umedecida. A membrana de nitrocelulose ficou reservada sobre um papel filtro em local limpo e seco por algumas horas, até que a membrana de nitrocelulose estivesse completamente seca. Em cada quadrante de  $1 cm^2$  foram aplicadas 10  $\mu$ g da fração de membranas totais. A aplicação das amostras ocorreu de forma que fossem gotejadas perpendicularmente sobre um dos quadrantes marcados na membrana de nitrocelulose e se espalhassem uniformemente. Aguardou-se o tempo suficiente pra que as amostras ficassem secas completamente.

Para a marcação das bombas vacuolares foram realizadas análises de wetern blotting. Foram aplicadas 10  $\mu$ g da fração microsomal extraídas de plantas de cana-de-açúcar em Gel de SDS 12%. Após a eletroforese, foi feita a transferência para uma membrana de nitrocelulose umedecida no tampão de transferência contendo tampão de corrida sem SDS, 70 mL  $H_2O$  e metanol. Após a transferência, a membrana foi deixada sob agitação em solução contendo solução de leite comercial (Molico) a 5% por 1 hora. Foram utilizados anticorpos

contra a subunidade B da V-H<sup>+</sup>-ATPase e contra a H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase (anticorpos primários). Os anticorpos primários foram diluídos 1:1000 em solução de leite comercial a 3% e incubados sob agitação por 30 minutos; após esse período a placa com a membrana foi deixada na geladeira “overnight”.

Na etapa seguinte de revelação foi comum tanto ao ensaio de dot quanto de wetern blotting. A membrana foi lavada com leite 5% por mais 1 hora em agitação trocando a solução a cada 15 minutos. O segundo anticorpo conjugado a peroxidase foi diluído 1:1000 em solução de leite a 5% e incubado por 1 hora em agitação. Após a incubação a membrana foi novamente lavada com solução de leite 5% em PBS 3x 10 minutos sob agitação. Posteriormente, a membrana foi lavada com PBS 3x 5 minutos sob agitação. Depois a membrana foi revelada em solução reveladora contendo H<sub>2</sub>O, Tris HCl 1M pH 7,5, DAB, imidazol e 30% de peróxido de hidrogênio. A membrana foi então descorada em uma placa contendo H<sub>2</sub>O e o sinal da ligação específica do anticorpo foi revelado e a imunoresposta detectada de acordo com Retamal et al. (1999).

#### **4.4.14. Análises dos dados**

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para testar as diferenças entre os genótipos com baixo e alto potencial para acumular sacarose. As médias foram comparadas através do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O erro padrão foi utilizado para demonstrar a variação dos dados.

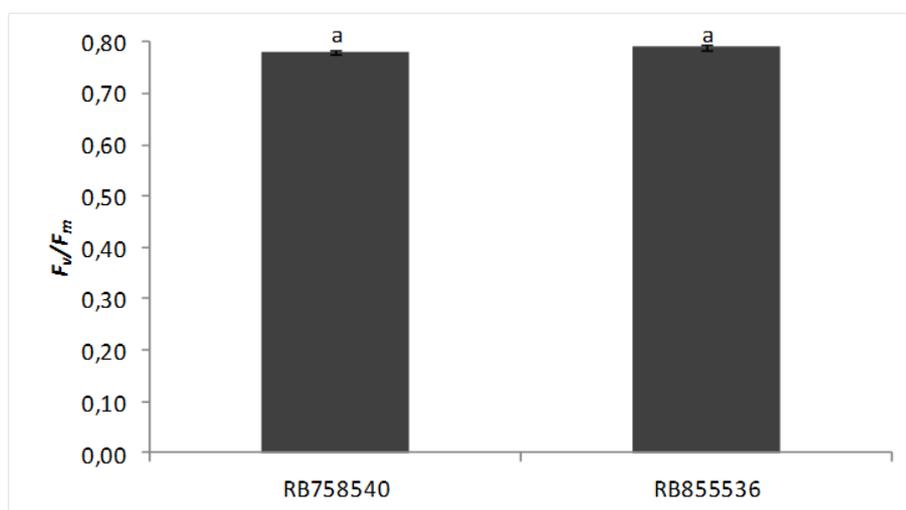
## 4.5. RESULTADO

### 4.5.1. Capacidade fotossintética de plantas jovens de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose

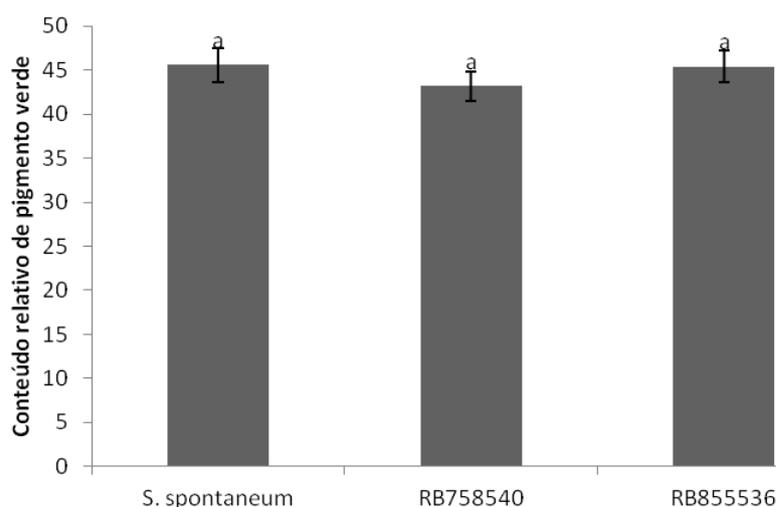
Os parâmetros fotossintéticos foram medidos no período da manhã, entre oito e dez horas, em três genótipos de cana-de-açúcar com dois meses de idade: *Sachharum spontaneum*, RB758540 e RB855536. Para uma caracterização inicial da capacidade fotossintética das plântulas de cana-de-açúcar foi analisado o rendimento quântico potencial do FSII ( $F_v/F_m$ ). Estas medições foram realizadas apenas nos híbridos interespecíficos, RB758540 e RB855536, e os valores apresentados para  $F_v/F_m$  mantiveram-se dentro da faixa preestabelecida - 0,75 a 0,85 - para plantas em condições ambientais não estressantes (Figura 6). Este resultado permite inferir, que as condições de cultivo em casa de vegetação não causaram estresse às plantas no estágio de desenvolvimento em que foram estudadas.

Também foi verificado o conteúdo relativo de pigmentos verdes nos três genótipos de cana-de-açúcar e os valores estão respresentados na figura 7. Nenhuma diferença significativa foi observada entre o genótipo parental *S. spontaneum* e os híbridos interespecíficos, RB758540 e RB855536 (Figura 7). Em seguida foram analisados os parâmetros relacionados às trocas gasosas e os resultados são mostrados na tabela 1. Os valores obtidos para a taxa de transpiração (E) e condutância estomática ( $g_s$ ) não diferiram estatisticamente

entre os genótipos *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Apesar de não significativo, RB758540, apresentou maior taxa de E e de  $g_s$ ,  $2,46 \pm 0,33$   $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e  $0,1 \pm 0,017$   $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 1).



**Figura 6:** Rendimento quântico potencial do FSII ( $F_v/F_m$ ) em plantas de cana-de-açúcar com 2 meses de idade dos genótipos RB758540 e RB855536. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .



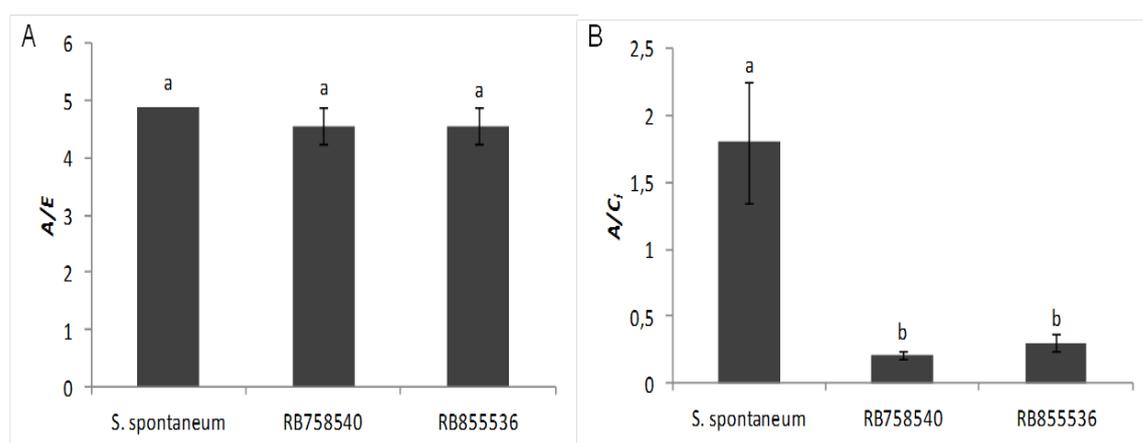
**Figura 7:** Conteúdo relativo de pigmento verde medido em folhas de cana-de-açúcar com 2 meses de idade dos genótipos *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

As principais diferenças observadas na capacidade fotossintética dos genótipos com baixo e alto potencial para acumular sacarose foram nas taxas de carbono interno ( $C_i$ ) e na fotossíntese líquida ( $A$ ). Os híbridos interespecíficos apresentaram uma maior concentração de  $C_i$  quando comparados à espécie selvagem, que apresentou uma taxa de  $5,48 \pm 1,02$  ppm  $\text{CO}_2$ . Entre os híbridos, a RB758540 se destacou com a maior taxa de  $C_i$ ,  $62,92 \pm 7,31$  ppm  $\text{CO}_2$ , seguida da variedade RB855536, que apresentou o valor de  $38,10 \pm 4,51$  ppm  $\text{CO}_2$ . A fotossíntese líquida ( $A$ ) não diferiu estatisticamente entre os genótipos estudados. Entretanto, pode-se observar valores de  $A$  relativamente maiores nas variedades RB758540 e RB855536,  $11,67 \pm 0,96$  e  $10,30 \pm 1,42$   $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1:** Valores de transpiração (E), condutância estomática ( $g_s$ ), carbono interno ( $C_i$ ) e fotossíntese líquida (A) em plantas de cana-de-açúcar com 2 meses de idade dos genótipos *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

Genótipos	Trocias Gasosas			
	E (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	$g_s$ (mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	$C_i$ (ppm CO <sub>2</sub> )	A ( $\mu$ mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
<i>S. spontaneum</i>	1,75 $\pm$ 0,04 a	0,07 $\pm$ 0,001 a	5,48 $\pm$ 1,02 c	8,52 $\pm$ 0,18 a
RB758540	2,46 $\pm$ 0,33 a	0,10 $\pm$ 0,017 a	62,92 $\pm$ 7,31 a	11,67 $\pm$ 0,96 a
RB855536	1,98 $\pm$ 0,18 a	0,07 $\pm$ 0,005 a	38,10 $\pm$ 4,51 b	10,30 $\pm$ 1,42 a

A partir dos dados de trocas gasosas pode-se estimar a eficiência no uso da água (EUA) e na utilização do carbono (EUC). EUA é definida como a razão entre o acúmulo de biomassa expresso em assimilação de  $\text{CO}_2$ , biomassa total ou produtividade dos grãos, sobre a água consumida expressa em transpiração, evapotranspiração ou entrada total de água no sistema (Sinclair et al. 1984). Neste trabalho a EUA foi expressa em razão da fotossíntese líquida/transpiração (A/E). Conforme a figura 8A observa-se que a A/E não apresentou diferenças significativas entre os genótipos. Em contrapartida, a razão  $A/C_i$ , um indicativo da eficiência carboxilativa das plantas, foi em média 4,5 vezes maior na *S. spontaneum* quando comparadas às variedades melhoradas com alto potencial para acumular sacarose (Figura 8B).



**Figura 8:** Eficiência no uso da água - A/E (A) e eficiência carboxilativa –  $A/C_i$  (B) medidas em colmos de plantas de cana-de-açúcar com 2 meses de idade dos genótipos *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

#### 4.5.2. Características morfológicas e anatômicas de plantas jovens de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose

Na tabela 2 estão representados os dados morfológicos e de produtividade da espécie parental e dos híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar com dois meses de idade. Neste estágio de desenvolvimento, foi possível observar que a

RB758540 e a RB855536, apresentaram maior diâmetro do colmo e número de feixes vasculares quando comparadas a *S. spontaneum*. Apenas o comprimento do colmo não apresentou diferenças significativas entre os três genótipos (Tabela 2). A produtividade da cana-de-açúcar foi expressa em termos de matéria fresca e os dados estão representados na tabela 2. Aos dois meses de idade, híbridos interespecíficos apresentaram um incremento de ~100% na matéria fresca quando comparadas à espécie selvagem (Tabela 2)

As características anatômicas foram avaliadas a partir de cortes transversais de colmos jovens dos genótipos *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Como mostrado na tabela 3, a variedade RB855536 apresentou maior área de parênquima,  $819008 \pm 46097 \mu\text{m}^2$ ; entretanto, não diferiu significativamente do valor apresentado pela espécie selvagem,  $724980 \pm 29920 \mu\text{m}^2$ . Dentre as variedades, RB758540 apresentou menor área de parênquima de preenchimento, de feixe vascular e de esclerênquima, já a *S. spontaneum* destacou-se com maior área de esclerênquima, de feixe vascular, de xilema e de floema quando comparada aos híbridos interespecíficos (Tabela 3).

**Tabela 2:** Características morfológicas do colmo e produtividade de plantas de cana-de-açúcar com 2 meses de idade dos genótipos *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

Genótipos	Comprimento do colmo (cm)	Diâmetro do colmo (mm)	N <sup>o</sup> de feixes vasculares (unidade)	Matéria Fresca (g)
<i>S.spontaneum</i>	7,17 $\pm$ 0,64 a	15,7 $\pm$ 0,77 b	41 $\pm$ 4,5 c	5,21 $\pm$ 0,47 b
RB758540	9,25 $\pm$ 0,75 a	18,23 $\pm$ 0,16 a	55 $\pm$ 2 b	10,22 $\pm$ 1,97 a
RB855536	7,34 $\pm$ 0,38 a	16,55 $\pm$ 0,47 ab	69 $\pm$ 1,5 a	11,90 $\pm$ 1,27 a

**Tabela 3:** Características anatômicas do colmo de plantas de cana-de-açúcar com 2 meses de idade dos genótipos *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

Genótipos	Área Parênq. Preench. ( $\mu\text{m}^2$ )	Área Feixe Vascular ( $\mu\text{m}^2$ )	Área Esclerênq. ( $\mu\text{m}^2$ )	Área Xilema ( $\mu\text{m}^2$ )	Área Floema ( $\mu\text{m}^2$ )
<i>S. spontaneum</i>	724980 $\pm$ 29920 a	17406 $\pm$ 433 a	2367 $\pm$ 179 a	1834 $\pm$ 61 a	1437 $\pm$ 102 a
RB758540	553897 $\pm$ 70147 b	10071 $\pm$ 1275 b	1188 $\pm$ 206 b	1465 $\pm$ 211 ab	637 $\pm$ 144 b
RB855536	819008 $\pm$ 46097 a	12544 $\pm$ 550 b	2202 $\pm$ 190 a	1132 $\pm$ 82 b	499 $\pm$ 24 b

#### 4.5.3. Conteúdo de açúcares e atividade da SPS e da IAV em plantas jovens de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose

Para avaliar o metabolismo de carboidratos no colmo de plântulas de cana-de-açúcar foram mensuradas as concentrações de glicose, frutose, sacarose e açúcares totais neste tecido, além da atividade das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS) e invertase ácida vacuolar (IAV). A sacarose foi o principal açúcar acumulado nos três genótipos de cana-de-açúcar aos dois meses de idade. O conteúdo de glicose, sacarose e açúcares totais não diferiu significativamente entre os genótipos com baixo e alto potencial para acumular sacarose. Apenas a variedade RB758540 diferiu estatisticamente entre os genótipos, apresentando o maior conteúdo de frutose,  $256 \pm 19 \text{ nm.g}^{-1} \text{ PF}$  (Tabela 4).

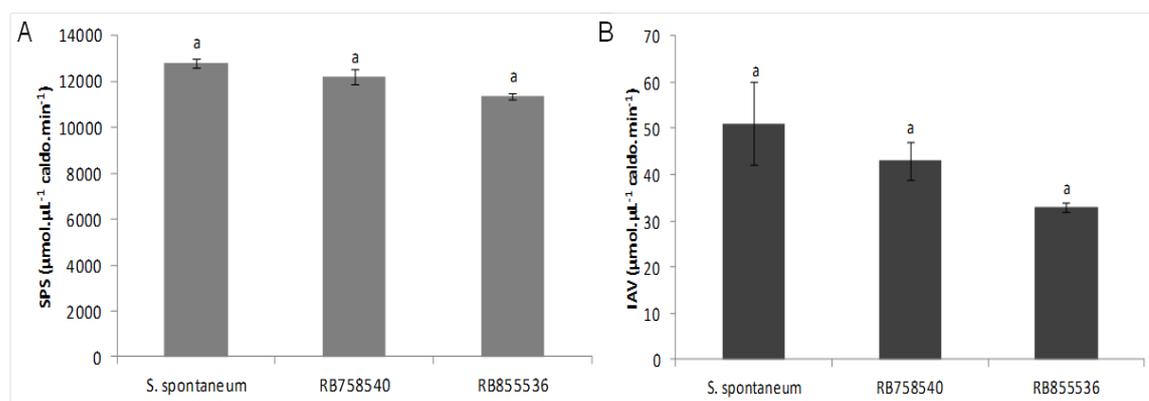
**Tabela 4:** Teor de açúcares em colmos de plantas de cana-de-açúcar com 2 meses de idade dos genótipos *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

Variedades	Teor de Açúcar ( $\text{nm.g}^{-1} \text{ PF}$ )			
	Glicose	Frutose	Sacarose	Total
<i>S. spontaneum</i>	$165 \pm 84 \text{ a}$	$126 \pm 1,5 \text{ b}$	$634 \pm 63 \text{ a}$	$926 \pm 85 \text{ a}$
RB758540	$67 \pm 6 \text{ a}$	$256 \pm 19 \text{ a}$	$713 \pm 108 \text{ a}$	$1040 \pm 139 \text{ a}$
RB855526	$108 \pm 40 \text{ a}$	$168 \pm 11 \text{ b}$	$641 \pm 147 \text{ a}$	$918 \pm 193 \text{ a}$

Após a análise do conteúdo dos açúcares, verificou-se a atividade das duas enzimas envolvidas no metabolismo primário da sacarose. A sacarose fosfato sintase (SPS) catalisa a reação de síntese de sacarose-6-fosfato, a partir dos monossacarídeos UDP-glicose e frutose-6-fosfato; e a invertase ácida vacuolar (IAV), é responsável pela hidrólise de sacarose em hexoses, para disponibilizar as células carbono e energia, necessárias a respiração celular, bem como para sínteses de compostos para o crescimento.

A figura 9A indica que a atividade da SPS não foi estatisticamente diferente entre os genótipos estudados, estes dados estão de acordo com os resultados

obtidos para concentração de sacarose que também não mostrou diferenças entre os genótipos. Para a atividade da IAV também não se observa distinção entre a *S. spontaneum* e os híbridos interespecíficos, durante o estágio inicial de desenvolvimento (Figura 9B).

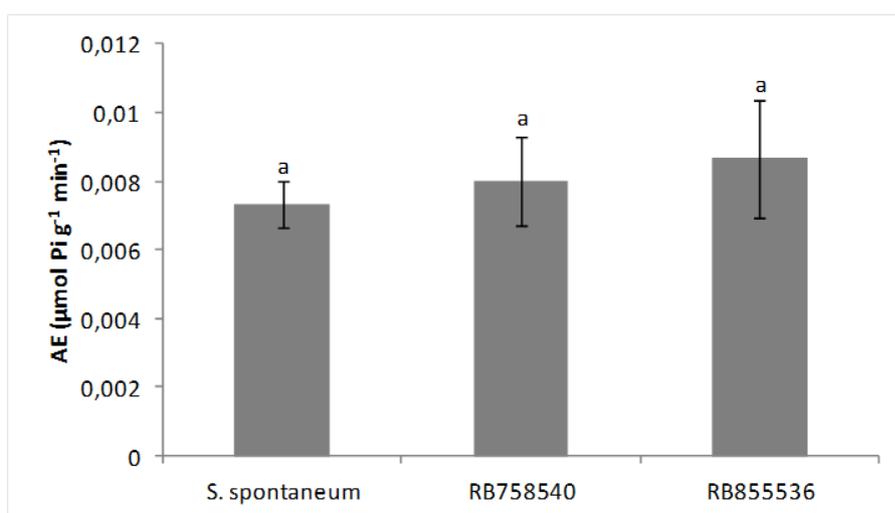


**Figura 9:** Atividade das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS) (A) e invertase ácida vacuolar (IAV) (B) medidas em colmos de cana-de-açúcar com 2 meses de idade dos genótipos *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão de três experimentos independentes. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

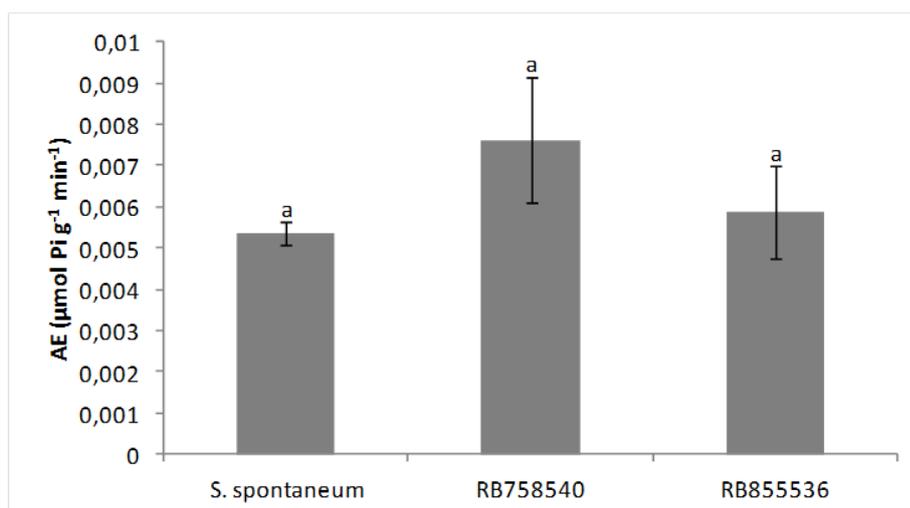
#### 4.5.4. Atividade e expressão das bombas de H<sup>+</sup> de membrana plasmática e de vacúolo em plantas jovens de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose

Plântulas de cana-de-açúcar foram utilizadas para verificar a atividade e a expressão das bombas de H<sup>+</sup>, de membrana plasmática e de vacúolo, em colmos de genótipos com diferentes potenciais para acumular sacarose. Inicialmente foram analisadas as atividades de hidrólise de ATP, pela H<sup>+</sup>-ATPase tipo P e V, e de PP<sub>i</sub>, pela H<sup>+</sup>-pirofosfatase e os resultados estão representados nas figuras 10, 11 e 12. Com dois meses de idade, tanto a atividade de hidrólise de ATP vanadato sensível quanto a atividade nitrato sensível não apresentaram diferenças significativas entre os três genótipos estudados (Figura 10 e 11). O mesmo ocorreu com a atividade de hidrólise de PP<sub>i</sub> (Figura 12). No entanto, o que

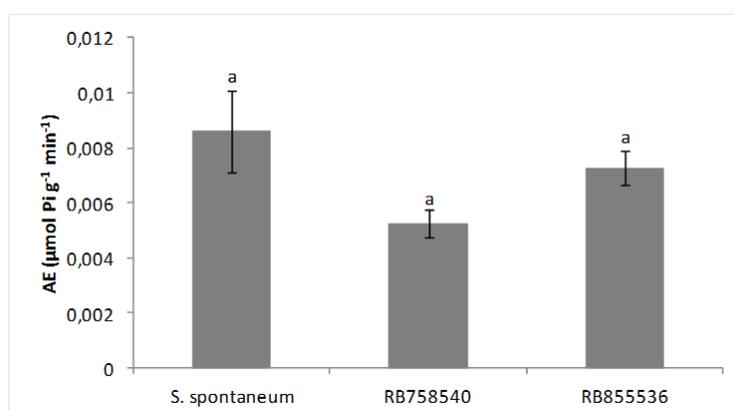
se observa neste estágio de desenvolvimento é uma maior atividade de H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase em relação às H<sup>+</sup>-ATPases tanto na espécie selvagem quanto nos híbridos interespecíficos. Na *S. spontaneum* e na RB855536, a atividade hidrolítica da H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase foi em média 25 e 50% maior que a hidrólise de ATP realizada pela P e pela V H<sup>+</sup>-ATPase, respectivamente. Já na RB758540 observa-se um equilíbrio maior entre as bombas, a hidrólise de PP<sub>i</sub> é apenas 5% maior que a hidrólise de ATP pela P-ATPase, e 15% maior que a da V-ATPase.



**Figura 10:** Atividade de hidrólise de ATP vanadato sensível medida em vesículas obtidas da fração microssomal extraída de tecidos do colmo de três genótipos de cana-de-açúcar com dois meses de idade: *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores representam a média ± erro padrão de três experimentos. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .



**Figura 11:** Atividade de hidrólise de ATP nitrato sensível medida em vesículas obtidas da fração microsossomal extraída de tecidos do colmo de quatro variedades de cana-de-açúcar com dois meses de idade: *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .



**Figura 12:** Atividade de hidrólise de PP<sub>i</sub> potássio dependente medida em vesículas obtidas da fração microsossomal extraída de tecidos do colmo de quatro variedades de cana-de-açúcar com dois meses de idade: *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

O transporte de  $H^+$  dependente de ATP e  $PP_i$  foi estimado pelo decréscimo da fluorescência da sonda sensível ao pH, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA) e então pode ser calculada a velocidade inicial de formação do  $\Delta pH$  ( $V_0$ ) e a fluorescência máxima (total) ( $\Delta F_{m\acute{a}x}$ ) nos diferentes genótipos de cana-de-açúcar. A velocidade inicial das  $H^+$ -ATPase tipo P e V foi maior nos híbridos. Entretanto, o gradiente de  $H^+$  formado por estas enzimas, aqui representado pela  $\Delta F_{m\acute{a}x}$ , não foi diferente entre a *S. spontaneum* e as variedades melhoradas (Tabela 5). A  $V_0$  de transporte de  $H^+$  dependente de  $PP_i$  foi maior na RB855536, que mostrou uma ativação de ~200% em relação a *S. spontaneum* e a RB758540 (Tabela 5). A  $\Delta F_{m\acute{a}x}$  da  $H^+$ -pirofosfatase foi superior nos híbridos interespecíficos, que apresentaram capacidade de bombeamento 5 vezes maior na RB758540 e 10,75 vezes maior na RB855536, quando comparadas à espécie selvagem (Tabela 5).

As análises de transporte de  $H^+$  também mostraram que na *S. spontaneum*, o gradiente de  $H^+$  gerado pelas  $H^+$ -ATPases é maior que o gerado pela  $H^+$ -pirofosfatase, e esta resposta fica evidenciada pela maior taxa de ( $\Delta F_{m\acute{a}x}$ ) das  $H^+$ -ATPases nesta espécie selvagem. Nos híbridos interespecíficos, nota-se um equilíbrio entre as bombas eletrogênicas com relação à formação do gradiente de  $H^+$  (Tabela 5).

**Tabela 5:** Atividade de transporte de H<sup>+</sup> (%) medida em vesículas obtidas da fração microsomal extraída de tecidos do colmo com quatro variedades de cana-de-açúcar com 2 meses de idade dos genótipos *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores representam médias ± erro padrão de três experimentos independentes. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a p>0,05%.

Genótipos	P-H <sup>+</sup> -ATPase		V-H <sup>+</sup> -ATPase		H <sup>+</sup> -PPase	
	V <sub>0</sub>	ΔF <sub>máx</sub>	V <sub>0</sub>	ΔF <sub>máx</sub>	V <sub>0</sub>	ΔF <sub>máx</sub>
<i>S. spontaneum</i>	8 ± 0,2 b	34 ± 0,5 a	7 ± 0,5 b	22 ± 1,0 a	5 ± 0,5 b	4 ± 0,3 c
RB758540	15 ± 1,2 a	29 ± 2,6 a	14 ± 1,9 a	21 ± 3,0 a	7 ± 0,9 b	20 ± 1,2 b
RB855536	11 ± 0,8 a	31 ± 0,7 a	15 ± 1,8 a	23 ± 3,1 a	17 ± 0,1 a	43 ± 2,4 a

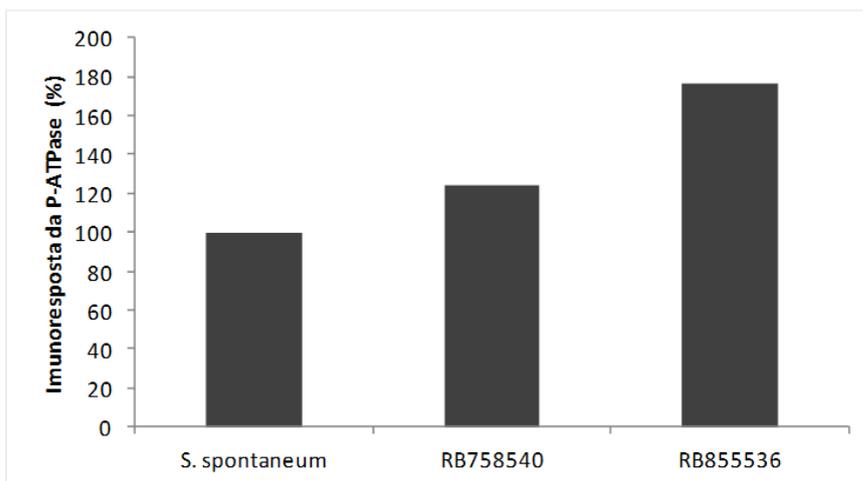
A taxa de acoplamento das bombas de  $H^+$  é obtida pela razão entre a velocidade inicial do transporte de  $H^+$  ( $V_0$ ) e a hidrólise de ATP (ou  $PP_i$ ). Quando ocorre o aumento do transporte de  $H^+$  dependente de ATP ou  $PP_i$ , sem alterar ou mesmo diminuir a hidrólise desses compostos, ocorrem incrementos na razão de acoplamento e conseqüentemente eleva a eficiência da bomba eletrogênica. Tomando a espécie selvagem, *S. spontaneum*, como controle observa-se que as bombas de  $H^+$  de membrana plasmática e de vacúolo estão mais acopladas nas variedades com alto potencial para acumular sacarose RB758540 e RB855536. Entre os híbridos interespecíficos, RB758540 se destacou com maior taxa de acoplamento da  $H^+$ -ATPase tipo P, já a RB855536, apresentou maior eficiência no acoplamento das bombas vacuolares, V-ATPase e  $H^+$ - $PP_i$ ase (Tabela 6). Assim como observado no transporte de  $H^+$ , na *S. spontaneum* as  $H^+$ -ATPases apresentaram maior eficiência na acoplamento. Enquanto na RB758540 e na RB855536, ocorre um balanço entre as  $H^+$ -ATPases e  $H^+$ -pirofosfatase (Tabela 6).

**Tabela 6:** Acoplamento entre transporte de  $H^+$  ( $V_0$ ) e atividade de hidrólise de ATP e  $PP_i$  medidas em tecidos do colmo jovem de três genótipos de cana-de-açúcar (*S. spontaneum*, RB758540 e RB855536). Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

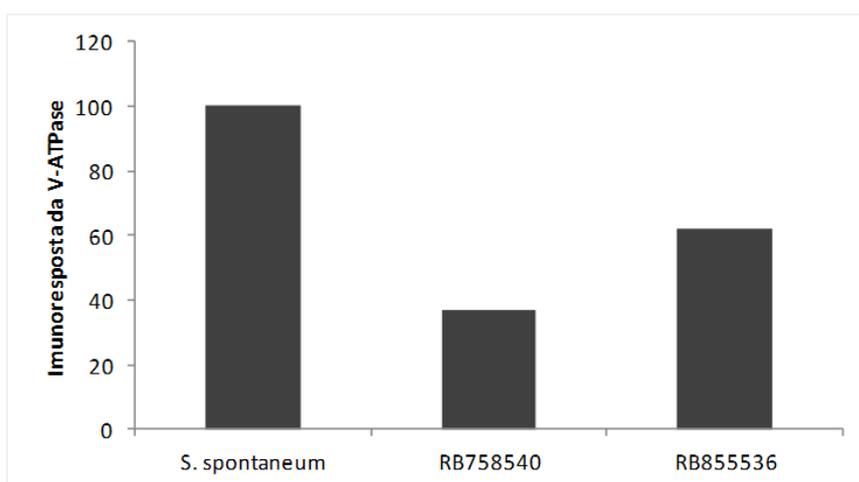
Acoplamento - $V_0$ (%) / AE ( $\mu\text{mol Pi g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )			
Genótipos	P-ATPase	V-ATPase	V- $PP_i$ ase
<i>S. spontaneum</i>	1121 $\pm$ 80 b	1365 $\pm$ 55 b	547 $\pm$ 20 c
RB758540	1890 $\pm$ 113 a	3079 $\pm$ 190 a	1078 $\pm$ 69 b
RB855536	1525 $\pm$ 154 a	4040 $\pm$ 136 a	2173 $\pm$ 71 a

Para verificar se as respostas observadas na atividade das bombas de  $H^+$  foram decorrentes de alterações na expressão destas enzimas realizou-se análises de imunomarcção com anticorpos específicos para  $H^+$ -ATPase tipo P, para subunidade B da  $H^+$ -ATPase tipo V e para  $H^+$ - $PP_i$ ase. Quando comparadas à imunoresposta da P-ATPase, as variedades RB758540 e RB855536

apresentaram um conteúdo de proteína, respectivamente, 24 e 76% maior que o da *S. spontaneum* (Figura 13). No caso da  $H^+$ -ATPase tipo V, a maior quantidade da subunidade B foi na espécie selvagem, que apresentou uma imunoresposta ~60% maior que a observada na variedade RB758540 e ~40% maior que da RB855536 (Figura 14).

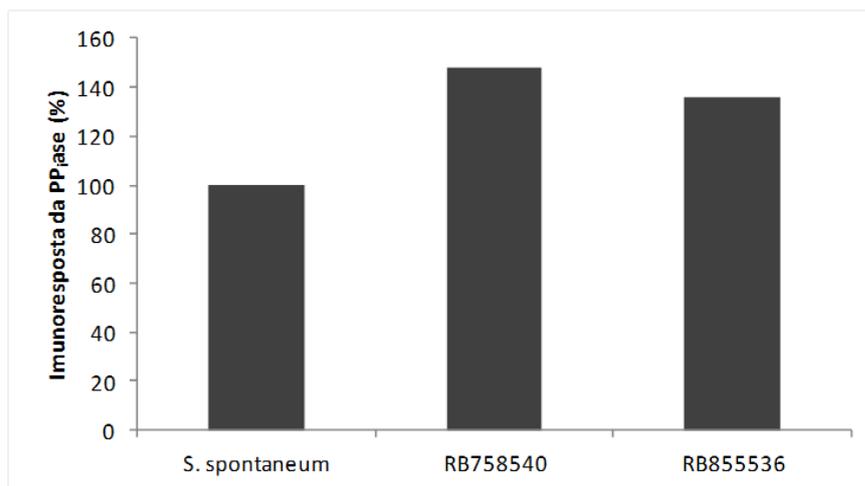


**Figura 13:** Imunoresposta da  $H^+$ -ATPase tipo P em amostras da fração microssomal extraídas de tecidos do colmo jovem de três variedades de cana-de-açúcar (*S. spontaneum*, RB758540 e RB855536).



**Figura 14:** Imunoresposta da  $H^+$ -ATPase tipo V em amostras da fração microssomal extraídas de tecidos do colmo jovem de três genótipos de cana-de-açúcar (*S. spontaneum*, RB758540 e RB855536).

Assim, com a P-ATPase, imunomarcção da  $H^+$ -pirofosfatase mostrou um conteúdo de proteína aumentado nos tecidos jovens do colmo dos híbridos com alta capacidade para acumular sacarose. Quando comparadas a *S. spontaneum*, este aumento foi de ~50% na variedade RB758540 e de ~40% na RB855536 (Figura 15).

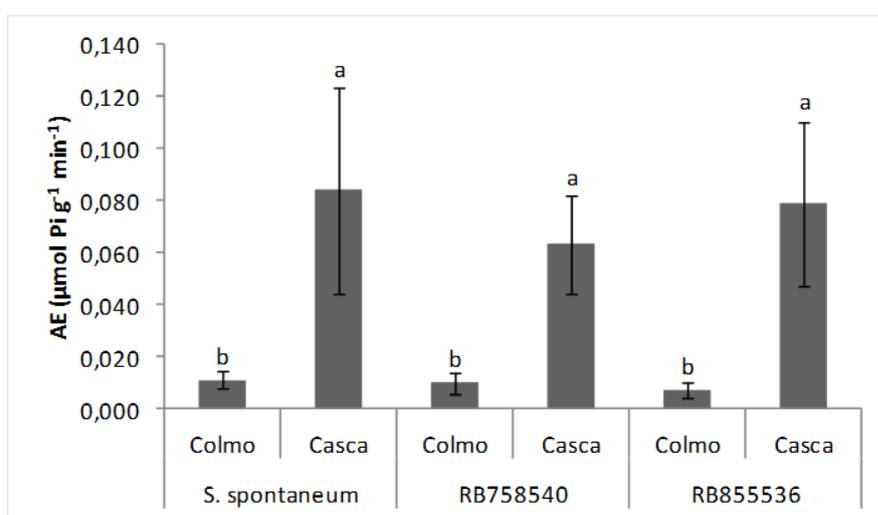


**Figura 15:** Imunoresposta da  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase vacuolar em amostras da fração microssomal extraídas de tecidos do colmo jovem de três genótipos de cana-de-açúcar (*S. spontaneum*, RB758540 e RB855536).

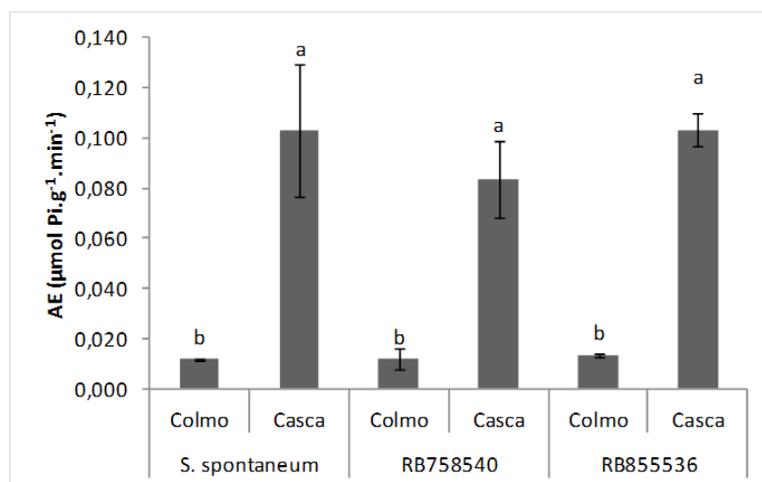
#### **4.5.5. Atividade e expressão das bombas de $H^+$ de membrana plasmática e de vacúolo em tecidos do colmo e da casca de plantas de cana-de-açúcar adultas com diferentes potenciais para acumular sacarose**

Após a caracterização da atividade e da expressão das bombas de  $H^+$  nos tecidos jovens de colmo, foram avaliadas as respostas destas enzimas nos tecidos adultos do colmo e também da casca dos genótipos *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. As plantas foram cultivadas em condição de campo na Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO/Campos dos Goytacazes) e coletadas para análises bioquímicas aos doze meses de idade. As atividades de hidrólise de ATP e de PP<sub>i</sub> medidas nas vesículas microssomais extraídas do tecido adulto da casca foram em média 10 vezes maior que a atividade observada no colmo dos genótipos *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536 (Figuras 16, 17 e 18).

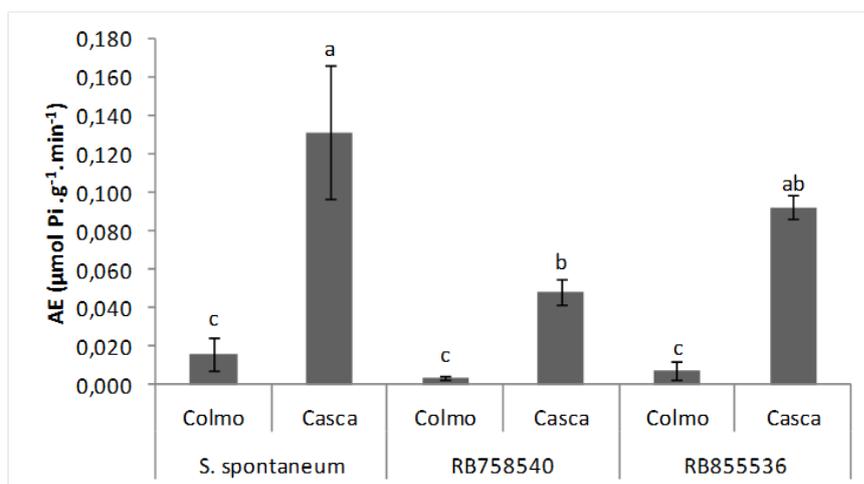
Assim como observado nas plantas com 2 meses de idade, os tecidos adultos do colmo e da casca não apresentaram diferenças significativas nas atividades de hidrólise de ATP vanadato e nitrato sensível entre os genótipos (Figura 16 e 17). O mesmo ocorreu com a hidrólise de  $PP_i$  no colmo, que também não apresentou valores estatisticamente diferentes entre as três variedades. Por outro lado, a atividade hidrolítica potássio dependente na casca mostrou ser significativamente diferente entre os genótipos. E a *S. spontaneum* destacou-se por apresentar uma atividade potássio dependente ~60 e ~30% maior que nas variedades RB758540 e RB855536, respectivamente (Figura 18).



**Figura 16:** Atividade de hidrólise de ATP vanadato sensível medida em vesículas obtidas da fração microssomal extraída de tecidos adultos do colmo e da casca de três variedades de cana-de-açúcar: *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores apresentados representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .



**Figura 17:** Atividade de hidrólise de ATP nitrato sensível medida em vesículas obtidas da fração microsomal extraída de tecidos adultos do colmo e da casca de três variedades de cana-de-açúcar: *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores apresentados representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .



**Figura 18:** Atividade de hidrólise de PP<sub>i</sub> potássio dependente medida em vesículas obtidas da fração microsomal extraída de tecidos adultos do colmo e da casca de três variedades de cana-de-açúcar: *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores apresentados representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

O transporte de  $H^+$  medido nas vesículas microssomais extraídas dos tecidos de plantas de cana-de-açúcar com 12 meses de idade mostra que tanto a  $V_0$  e quanto a  $\Delta F_{\max}$  é maior no tecido da casca nos três genótipos estudados (Figura 7). As  $H^+$ -ATPases tipo P e V no tecido externo apresentaram em média um incremento de 2,6 vezes no transporte de  $H^+$ , enquanto para  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase este incremento na atividade da casca foi ainda maior com os genótipos *S. spontaneum*, RB855536 e RB758540 apresentando taxas de transporte de  $H^+$  entre 5 e 11 vezes maior que no colmo (Tabela 7). A atividade de transporte de  $H^+$  foi bastante estável nos tecidos do colmo, não sendo observadas diferenças significativas nas  $V_0$  e na  $\Delta F_{\max}$  entre os três genótipos. Por outro lado, nota-se que a principal diferença na atividade de transporte de  $H^+$ , entre a *S. spontaneum*, e os híbridos com alta produtividade, está no tecido da casca (Tabela 7).

A  $V_0$  da  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática na casca das variedades RB758540 e RB855536 foi, respectivamente, ~80 e 47% maior que a atividade apresentada pela *S. spontaneum*. Para as bombas de  $H^+$  vacuolares, as diferenças na taxa de  $V_0$  entre o genótipo selvagem e os comerciais são ainda maiores. A velocidade da V-ATPase foi ~100% superior nos híbridos interespecíficos, já na  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase o incremento na taxa de  $V_0$  foi de ~77% na RB758540 e ~100% na RB855536, em relação à espécie selvagem. A  $\Delta F_{\max}$ , que expressa o gradiente de  $H^+$  formado pelas bombas eletrogênicas também foi maior nos híbridos interespecíficos (Tabela 7).

**Tabela 7:** Atividade de transporte de H<sup>+</sup> (%) medida em vesículas obtidas da fração microsomal extraída de tecidos do colmo com quatro variedades de cana-de-açúcar com 2 meses de idade dos genótipos *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536. Os valores representam médias ± erro padrão de três experimentos independentes. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a p>0,05%.

Genótipos	Tecido	P-H <sup>+</sup> -ATPase		V-H <sup>+</sup> -ATPase		H <sup>+</sup> -PP <sub>i</sub> ase	
		V <sub>0</sub>	ΔF <sub>máx</sub>	V <sub>0</sub>	ΔF <sub>máx</sub>	V <sub>0</sub>	ΔF <sub>máx</sub>
<i>S. spontaneum</i>	Colmo	10 ± 1,2	20 ± 2,4	10 ± 1,7	14 ± 0,9	5 ± 1,2	11 ± 2,1
		Ba	Ba	Ba	Ba	Ba	Ba
	Casca	23 ± 2,0	78 ± 3,4	19 ± 3,0	44 ± 1,2	27 ± 0,5	58 ± 3,1
		Ab	Ab	Ab	Ab	Ab	Ab
RB758540	Colmo	11 ± 1,3	23 ± 1,4	13 ± 2,2	22 ± 1,7	9 ± 2,7	14 ± 1,7
		Ba	Ba	Ba	Ba	Ba	Ba
	Casca	42 ± 1,7	114 ± 7,5	37 ± 4,6	78 ± 9,5	48 ± 2,1	112 ± 6,2
		Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa
RB855536	Colmo	13 ± 1,6	20 ± 0,9	16 ± 5,2	21 ± 3,1	5 ± 1,9	8 ± 0,4
		Ba	Ba	Ba	Ba	Ba	Ba
	Casca	34 ± 2,8	97 ± 2,4	39 ± 5,6	102 ± 23,2	56 ± 19,6	100 ± 34,7
		Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa

Letras maiúsculas referem-se às diferenças observadas entre os tecidos analisados. Letras minúsculas, às diferenças observadas entre os genótipos no tecido do colmo ou da casca.

Utilizando a razão entre a velocidade inicial do transporte de  $H^+$  ( $V_0$ ) e a hidrólise de ATP ou  $PP_i$  pode-se verificar a eficiência das  $H^+$ -ATPases e da  $H^+$ -PPiase nos tecidos do colmo e da casca da espécie parental e comparar com a eficiência destas bombas nos híbridos interespecíficos. As maiores taxas de acoplamento das  $H^+$ -ATPase tipo P e V e da  $H^+$ -PPiase foram observadas no colmo, que apresentaram, em média, valores 3 vezes maiores que as taxas de acoplamento da casca nas três variedades de cana-de-açúcar, *S. spontaneum*, RB758540 e RB855536 (Tabela 8).

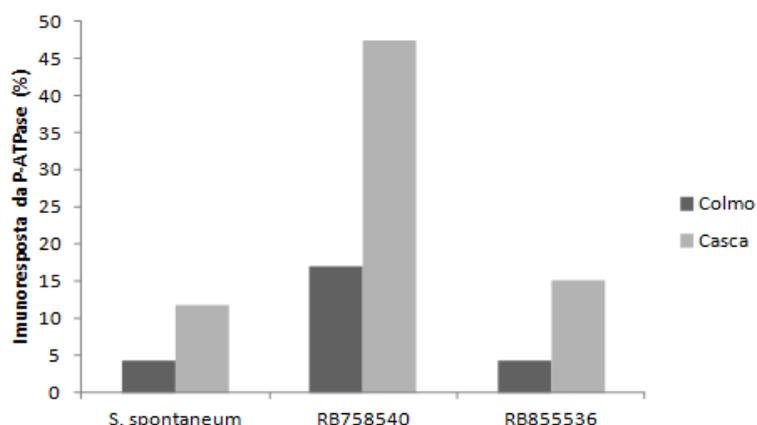
No colmo, apenas a RB855536 apresentou diferenças significativas, com maior eficiência da P-ATPase. Para V-ATPase não foi observada diferença entre os genótipos. No entanto, os híbridos interespecíficos mostraram ter  $H^+$ -pirofosfatase mais eficientes no tecido do colmo quando comparados a *S. spontaneum* (Tabela 8). Com relação à casca, as bombas vacuolares foram mais eficientes nos híbridos. Na RB758540, a  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática foi mais eficiente, com uma taxa de acoplamento ~60 maior que a apresentada pela *S. spontaneum* e RB855536 (Tabela 8).

**Tabela 8:** Taxa de acoplamento entre transporte de  $H^+$  ( $V_0$ ) e atividade de hidrólise de ATP e  $PP_i$  medida em tecidos do colmo e da casca de três genótipos de cana-de-açúcar (*S. spontaneum*, RB758540 e RB855536). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

Genótipos	Tecido	Acoplamento $-V_0$ (%) / AE ( $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )		
		P-ATPase	V-ATPase	V- $PP_i$ ase
<i>S. spontaneum</i>	Colmo	1018 $\pm$ 176 Ab	890 $\pm$ 84 Aa	1437 $\pm$ 147 Ab
	Casca	361 $\pm$ 85 Bb	194 $\pm$ 14 Bb	225 $\pm$ 29 Bb
RB758540	Colmo	1062 $\pm$ 139 Ab	1103 $\pm$ 170 Aa	2932 $\pm$ 411 Aa
	Casca	594 $\pm$ 50 Ba	475 $\pm$ 66 Ba	1000 $\pm$ 51 Ba
RB855536	Colmo	1680 $\pm$ 218 Aa	1197 $\pm$ 173 Aa	1762 $\pm$ 194 Aa
	Casca	331 $\pm$ 27 Bb	371 $\pm$ 19 Ba	506 $\pm$ 87 Ba

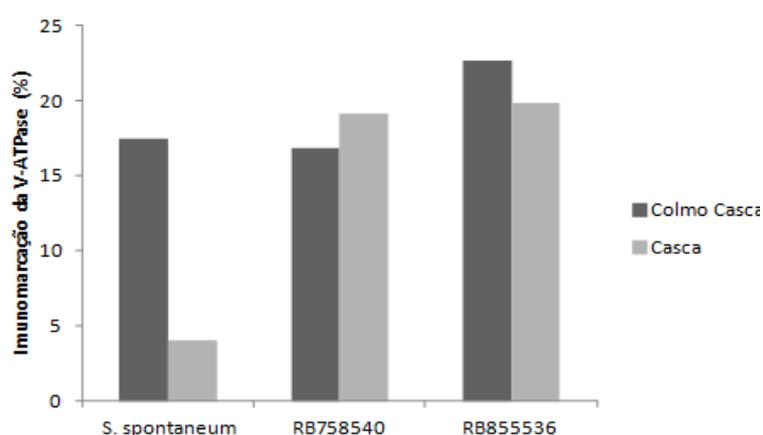
Letras maiúsculas referem-se às diferenças observadas entre os tecidos do colmo e da casca. Letras minúsculas, às diferenças observadas entre os genótipos no tecido do colmo ou da casca.

As análises para avaliar a expressão das bombas de prótons nos tecidos do colmo e da casca da cana-de-açúcar foram realizadas com anticorpos específicos para  $H^+$ -ATPase tipo P, para subunidade B da  $H^+$ -ATPase tipo V e para  $H^+$ - $PP_i$ ase. A figura 19 representa os valores relativos da imunoresposta da P-ATPase que apresentou maior conteúdo proteico nos tecidos da casca dos três genótipos estudados. Entre as variedades, a RB758540 foi a que destacou com uma maior expressão desta enzima de membrana plasmática tanto no colmo quanto na casca (Figura 19).



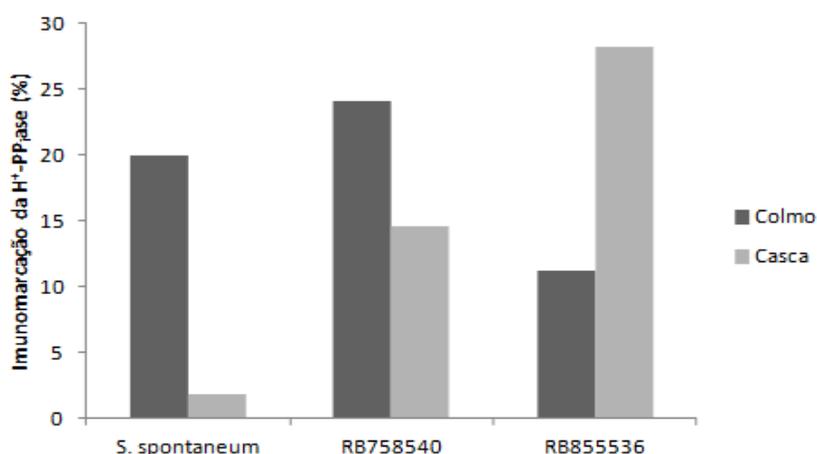
**Figura 19:** Imunomarcção da  $H^+$ -ATPase tipo P em amostras da fração microssomal extraídas de tecidos do colmo e da casca de três variedades de cana-de-açúcar (*S. spontaneum*, RB758540 e RB855536).

A expressão da subunidade B da V-ATPase, uma subunidade do domínio catalítico  $V_1$ , foi em média 4,5 vezes maior no colmo da *S. spontaneum* quando comparada à sua expressão na casca. Nos híbridos interespecíficos, RB855536 e RB758540, não houve diferenças nos conteúdos desta enzima entre os tecidos estudados (colmo e casca). Entretanto, o que se observa é que em relação à casca da *S. spontaneum* ocorre um aumento significativo na expressão de subunidade B nas variedades com alto potencial para acumular sacarose (Figura 20).



**Figura 20:** Imunomarcção da  $H^+$ -ATPase tipo V em amostras da fração microssomal extraídas de tecidos do colmo e da casca de três variedades de cana-de-açúcar (*S. spontaneum*, RB758540 e RB855536).

No colmo dos genótipos *S. spontaneum* e RB758540 a expressão de H<sup>+</sup>-pirofosfatase foi maior que na casca. Entretanto, na RB855536 observa-se um perfil diferente com um maior conteúdo desta enzima localizado no tecido da casca (Figura 21). Assim como observado na imunoresposta da V-ATPase (Figura 20), a expressão da H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase na casca das variedades melhoradas com alto potencial para acumular sacarose é superior à observada na casca da *S. spontaneum*. Na casca da RB758540 a quantidade de H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase, é em média 7,5 vezes maior do que na casca da espécie selvagem. Na casca da RB855536, a diferença em relação a *S. spontaneum* é ainda maior, com uma imunoresposta 14 vezes superior à observada na espécie selvagem (Figura 21).



**Figura 21:** Imunomarcagem da H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase em amostras da fração microsossomal extraídas de tecidos do colmo e da casca de três variedades de cana-de-açúcar (*S. spontaneum*, RB758540 e RB855536).

#### 4.5.6. Cinética das bombas de H<sup>+</sup> de membrana plasmática e de vacúolo em genótipos de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose

Após a caracterização da atividade e expressão das bombas de H<sup>+</sup> de membrana plasmática e de vacúolo foram avaliados os parâmetros da cinética Michaeliana - K<sub>m</sub> e V<sub>máx</sub> - destas enzimas. Na tabela 9 e 10 estão representados, respectivamente, os dados de K<sub>m</sub> e V<sub>máx</sub> da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática. No tecido jovem do colmo e na casca da *S. spontaneum* o K<sub>m</sub> foi maior em relação aos híbridos, contudo os valores não diferiram estatisticamente. Apenas no colmo das

plantas com 12 meses de idade houve diferenças significativas e a *S.spontaneum* se destacou apresentando um  $K_m$  maior que a RB758540 e RB855536 (Tabela 11). Entre os genótipos não se observou diferenças significativas na  $V_{m\acute{a}x}$  da P-ATPase medidas no colmo jovem. Entretanto, no colmo com 12 meses, a RB855536 se destacou com a menor taxa de  $V_{m\acute{a}x}$  desta enzima, enquanto *S. spontaneum* e RB758540 não diferiram entre si. No tecido da casca, a  $V_{m\acute{a}x}$  da P-ATPase dos híbridos interespecíficos foi aproximadamente 2 vezes maior que na *S. spontaneum*. (Tabela 12).

**Tabela 9:**  $K_m$  (mM) da  $H^+$ -ATPase tipo P medido em tecidos do colmo jovem (2 meses) e adulto (12 meses) e da casca (12 meses) de variedades de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p>0,05\%$ .

$K_m$ (mM)	Colmo	Colmo	Casca
Genótipos	2 meses	12 meses	12 meses
<i>S. spontaneum</i>	0,32 $\pm$ 0,14 a	0,79 $\pm$ 0,02 a	0,53 $\pm$ 0,13 a
RB758540	0,22 $\pm$ 0,08 a	0,52 $\pm$ 0,02 b	0,68 $\pm$ 0,06 a
RB855536	0,21 $\pm$ 0,05 a	0,54 $\pm$ 0,05 b	0,87 $\pm$ 0,26 a

**Tabela 10:**  $V_{m\acute{a}x}$  da  $H^+$ -ATPase tipo P medida em tecidos do colmo jovem (2 meses) e adulto (12 meses) e da casca (12 meses) de variedades de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p>0,05\%$ .

$V_{m\acute{a}x}$	Colmo	Colmo	Casca
Genótipos	2 meses	12 meses	12 meses
<i>S. spontaneum</i>	177 $\pm$ 50 a	2222 $\pm$ 241 a	339 $\pm$ 98 a
RB758540	180 $\pm$ 59 a	1865 $\pm$ 281 a	675 $\pm$ 161 b
RB855536	199 $\pm$ 56 a	1315 $\pm$ 305 b	755 $\pm$ 80 b

A espécie selvagem apresentou maior  $K_m$  para V-ATPase, em relação aos híbridos, tanto nos tecidos do colmo com dois meses quanto aos doze meses de idade. Na casca da variedade RB855536, o  $K_m$  desta enzima foi de  $2,78 \pm 1,18$  mM, valor este ~275% maior que o da *S. spontaneum* e ~1000% maior que o da RB758540 (Tabela 11). A variedade RB758540 destacou-se por apresentar a maior taxa de  $V_{m\acute{a}x}$  para ATPase vacuolar tanto no colmo jovem, quanto no colmo adulto; porém, os valores obtidos para os três genótipos não foram estatisticamente diferentes. Apenas no tecido da casca houve diferenças significativas nos valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e a RB855536 se destacou a maior velocidade,  $3254 \pm 894$  (Tabela 12).

Com relação aos parâmetros cinéticos da  $H^+$ -pirofosfatase, mostrados nas tabelas 13 e 14, observa-se que o genótipo *S. spontaneum* se destacou com o maior  $K_m$  e a RB758540 com o menor entre os genótipos com dois meses de idade. Com doze meses, tanto nos tecidos do colmo quanto da casca não houve diferenças significativas nos valores do  $K_m$  nos três genótipos (Tabela 13). A  $V_{m\acute{a}x}$  da  $H^+$ -pirofosfatase não diferiu entre as variedades nos tecidos do colmo jovem e adulto. Entretanto **[Porém]**, nos tecidos da casca a variedade RB855536 apresentou maior velocidade máxima (Tabela 14).

**Tabela 11:**  $K_m$  (mM) da  $H^+$ -ATPase tipo V medido em tecidos do colmo jovem (2 meses) e adulto (12 meses) e da casca (12 meses) de variedades de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

$K_m$ (mM)	Colmo	Colmo	Casca
Genótipos	2 meses	12 meses	12 meses
<i>S. spontaneum</i>	$1,17 \pm 0,42$ a	$0,63 \pm 0,10$ a	$0,74 \pm 0,12$ a
RB758540	$0,17 \pm 0,02$ b	$0,27 \pm 0,04$ b	$0,25 \pm 0,04$ b
RB855536	$0,72 \pm 0,25$ a	$0,38 \pm 0,03$ b	$2,78 \pm 1,18$ c

**Tabela 12:**  $V_{\text{máx}}$  da  $H^+$ -ATPase tipo V medida em tecidos do colmo jovem (2 meses) e adulto (12 meses) e da casca (12 meses) de variedades de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

$V_{\text{máx}}$	Colmo	Colmo	Casca
Genótipos	2 meses	12 meses	12 meses
<i>S. spontaneum</i>	177 $\pm$ 21 a	1507 $\pm$ 433 a	691 $\pm$ 77 a
RB758540	230 $\pm$ 38 a	1698 $\pm$ 144 a	849 $\pm$ 72 a
RB855536	133 $\pm$ 39 a	1275 $\pm$ 190 a	3254 $\pm$ 894 c

**Tabela 13:**  $K_m$  (mM) da  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase medido em tecidos do colmo jovem (2 meses) e adulto (12 meses) e da casca (12 meses) de variedades de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

$K_m$ (mM)	Colmo	Colmo	Casca
Genótipos	2 meses	12 meses	12 meses
<i>S. spontaneum</i>	0,46 $\pm$ 0,16 a	0,12 $\pm$ 0,0 a	0,21 $\pm$ 0,12 a
RB758540	0,06 $\pm$ 0,01 b	0,13 $\pm$ 0,05 a	0,07 $\pm$ 0,01 a
RB855536	0,20 $\pm$ 0,06 a	0,10 $\pm$ 0,04 a	0,11 $\pm$ 0,03 a

**Tabela 14:**  $V_{\text{máx}}$  da  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase medida em tecidos do colmo jovem (2 meses) e adulto (12 meses) e da casca (12 meses) de variedades de cana-de-açúcar com diferentes potenciais para acumular sacarose. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a  $p > 0,05\%$ .

$V_{\text{máx}}$	Colmo	Colmo	Casca
Genótipos	2 meses	12 meses	12 meses
<i>S. spontaneum</i>	474 $\pm$ 89 a	762 $\pm$ 168 a	533 $\pm$ 218 a
RB758540	258 $\pm$ 56b	602 $\pm$ 179 a	598 $\pm$ 154 a
RB855536	377 $\pm$ 87 a	438 $\pm$ 102 a	824 $\pm$ 285 a

#### 4.6. DISCUSSÃO

A cana-de-açúcar é a principal matéria-prima para produção de bioenergia na atualidade. Isto implica na necessidade de aumentar produtividade desta cultura, para atender a crescente demanda por seus derivados. Resultados positivos têm sido obtidos com o desenvolvimento de variedades novas e mais produtivas. Mas, o processo tradicional de intercruzamentos baseados na fenotipagem clássica tem sido dispendioso tanto em termos econômicos quanto no tempo necessário para a obtenção de híbridos com produtividade diferenciada em condições de campo. Isto se deve principalmente à escassez de conhecimentos básicos sobre determinantes fisiológicos, bioquímicos e genéticos que regulam o acúmulo de sacarose nesta cultura (Casu et al., 2003). Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi estudar a bioenergética da cana-de-açúcar e identificar diferenças entre os genótipos, a fim de, selecionar marcadores bioquímicos que possam ser associados com fenótipos de elevada concentração de sacarose no colmo e/ou produção de biomassa. Para tanto foram utilizados a espécie parental, *S. spontaneum*, que apresenta baixo acúmulo de sacarose, elevado conteúdo de fibras e resistência a estresses ambientais, e dois híbridos interespecíficos, RB758540 e RB855536, com alto potencial para acumular sacarose.

A cana-de-açúcar possui elevado desempenho fotossintético, portanto, verificou-se possíveis diferenças na capacidade de conversão de energia radiante em energia química entre os genótipos com diferentes produtividades. Foram analisados

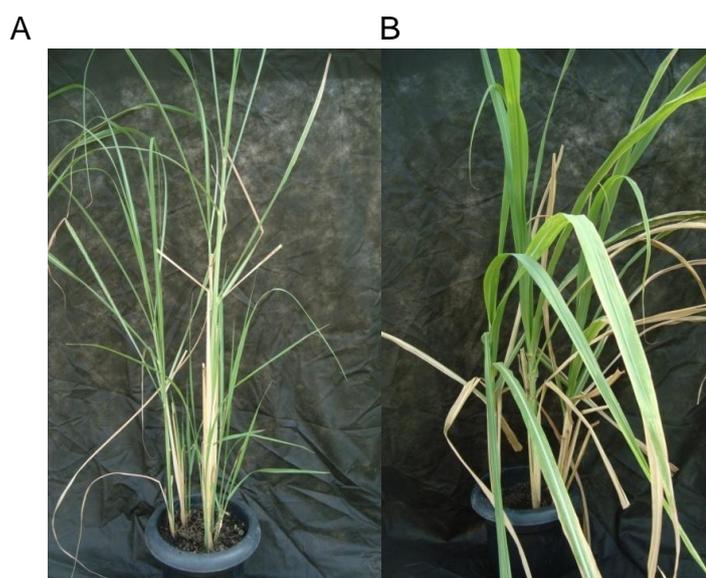
parâmetros como trocas gasosas, eficiência no uso da água e do carbono em plantas com dois meses de idade. Sob condições controladas de cultivo, o conteúdo de pigmentos totais (Figura 7), as taxas de transpiração (E), a condutância estomática ( $g_s$ ) (Tabela 1) e a eficiência na utilização da água (A/E) não apresentaram diferenças significativas entre os genótipos de cana-de-açúcar (Figura 8A). Por apresentar metabolismo C4, a cana-de-açúcar pode manter abertura estomática menor que plantas de metabolismo C3, o que necessariamente implica em menores perdas e uma maior eficiência no uso da água. Os resultados similares obtidos para os parâmetros citados acima indicam que estes podem se apresentar conservados entre os genótipos com diferentes potenciais produtivos, ou seja, tais parâmetros não poderiam ser úteis como marcadores de genótipos mais promissores. Contudo, E,  $g_s$ , e A/E podem ser características intrínsecas da cana-de-açúcar, que faz com que esta cultura se destaque energeticamente como mais promissora para produção de biocombustíveis dentre as demais espécies cultivadas para tal finalidade (Waclawovsky et al., 2010).

Por outro lado, neste estágio de desenvolvimento as diferenças observadas entre a espécie selvagem e as variedades melhoradas estão diretamente relacionadas com a assimilação de carbono pelas plantas. As variedades com elevado potencial para acumular sacarose, RB758540 e RB855536, apresentaram maior concentração de carbono interno ( $C_i$ ) e, apesar de não diferir estatisticamente, maior fotossíntese líquida (A) quando comparadas à espécie selvagem (Tabela 1). Já a *S. spontaneum* destacou-se com uma maior eficiência carboxilativa (A/ $C_i$ ) (Figura 8B). Possivelmente, o incremento observado nas taxas de  $C_i$  e de A nos híbridos interespecíficos foi decorrente do melhoramento genético nestas variedades e estão relacionadas à capacidade de estocar altas concentrações de sacarose e biomassa. Na *S. spontaneum*, a maior A/ $C_i$  expressa a maior eficiência carboxilativa (Figura 8B), que pode estar relacionada à síntese de fibras, ao perfilhamento abundante e/ou ao rápido crescimento desta espécie na fase inicial de desenvolvimento (Magro et al., 2011).

Sabe-se que uma parte do carbono fotoassimilado é utilizada para garantir o crescimento da planta, enquanto outra parte é exportada para os órgãos e tecidos onde será armazenada ou estocada como reserva. Na fase inicial de desenvolvimento, os fotossíntatos são principalmente utilizados para o crescimento da planta. Como toda atividade metabólica, o crescimento da brotação também é regulado pela programação

genética específica de cada variedade (Lingle, 1999). As características varietais definem o número de colmos por planta, a altura, o diâmetro do colmo, o comprimento e a largura das folhas e a arquitetura da parte aérea; sendo a expressão destes caracteres muito influenciados pelo clima, pelo manejo e pelas práticas culturais observadas. Se as condições ambientais forem ideais, o crescimento será ditado pelo genótipo vegetal, e cada variedade tem um distinto potencial de crescimento (Magro et al., 2011).

Neste trabalho avaliou-se o crescimento das plantas aos 2 meses de idade, mantidas em condições controladas, através de análises da morfologia e da anatomia da cana-de-açúcar. Na figura 22, podem-se identificar visualmente características distintas entre os genótipos *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Como já mencionado neste trabalho as atuais variedades foram derivadas de cruzamentos iniciais entre a *S. officinarum* (espécie selvagem com alto potencial para acumular sacarose) e *S. spontaneum* (espécie selvagem com baixo potencial para acumular sacarose e resistente a estresses ambientais). Os híbridos interespecíficos possuem um fenótipo bastante semelhante a *S. officinarum*, com folhas largas e maior diâmetro do colmo. Em contrapartida, a *S. spontaneum* apresenta folhas e colmos mais finos, porém emite mais perfilhos e apresenta maior resistência aos diversos estresses ambientais.



**Figura 22:** Plantas de cana-de-açúcar das espécies selvagens: *S. officinarum* (A) e *S. spontaneum* (B).

As análises morfológicas mostraram que os híbridos interespecíficos, RB758540 e RB855536, apresentaram maior diâmetro do colmo, número de feixes vasculares e matéria fresca (Tabela 2), o que pode ser o reflexo das maiores taxas de  $C_i$  e de A apresentadas por estas variedades (Tabela 1). Além disso, o híbrido RB855536, com alto potencial para acumular sacarose, aos dois meses de idade já se destacou com maior área de parênquima de preenchimento (Tabela 3), que é a região do colmo onde o açúcar é acumulado. Por outro lado, a *S. spontaneum*, que apresentou características morfológicas inferiores aos híbridos interespecíficos, obteve uma anatomia diferenciada com maior área de feixe vascular, de xilema e de floema (Tabela 3). Este genótipo também apresentou maior área de esclerênquima (Tabela 3), que inclui fibras e esclereídes, e outros tecidos de sustentação que representam uma maior produção de fibras, característica desta espécie selvagem. Esta diferenciação anatômica da *S. spontaneum* pode representar um indicador de genótipos que apresentam um rápido crescimento, atingindo o seu estágio de maturação precocemente, o que pode ser uma característica importante para programas de seleção visando à produção de bioetanol celulósico, estratégia dita de segunda geração (Matsuoka et al., 2009).

O metabolismo dos açúcares é vital em todas as fases do ciclo de vida da planta. Na cana-de-açúcar o início do armazenamento da sacarose no colmo é dependente da maturidade dos tecidos, ou seja, a maturação natural reduz a força do dreno para o crescimento estrutural da planta e induz a estocagem de açúcares. Neste trabalho foram avaliadas possíveis diferenças no acúmulo de açúcares nos genótipos com diferentes potenciais para acumulação ainda nos estágios iniciais de desenvolvimento. Foram dosados o conteúdo de glicose, a frutose, a sacarose e os açúcares totais nas plantas de cana-de-açúcar com dois meses de idade. A sacarose mostrou ser o principal açúcar encontrado no colmo dos três genótipos estudados, mas nenhuma diferença foi observada na quantidade deste açúcar e dos açúcares totais entre os genótipos com baixo acúmulo, *S. spontaneum*, e os de alto acúmulo de sacarose (Tabela 4). Nos colmos imaturos a sacarose é rapidamente estocada, e com igual rapidez, retirada do armazenamento para ser metabolizada para a formação dos tecidos novos da planta.

As principais enzimas do metabolismo da sacarose são a sacarose fosfato sintase, que sintetiza a sacarose (SPS), e a invertase (IAV), que hidrolisa. Aos dois meses a atividade das enzimas SPS e IAV também não foi diferente entre os genótipos (Figura 9). Os resultados desse trabalho estão de acordo com os obtidos por Lingle (1999), que constatou que nos genótipos de cana-de-açúcar verificados com pequenas diferenças na concentração de sacarose, não se observa diferenças na atividade da invertase ácida, invertase neutra, sacarose sintase e sacarose fosfato sintase. Em conjunto, os presentes dados e os deste estudo prévio, sugerem que tanto o conteúdo de açúcares quanto a atividade das enzimas do metabolismo de sacarose, não funcionariam como bons marcadores relacionados a fenótipos de maior produtividade, pelo menos em prospecções feitas nos estágios ainda iniciais de desenvolvimento.

Diante do exposto, testou-se então a atividade e expressão das  $H^+$ -ATPases, tipo P e V, e da  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase no colmo jovem da cana-de-açúcar. Uma vez que estas enzimas são responsáveis pela energização de transportadores secundários estando, portanto, diretamente relacionadas ao acúmulo e à remobilização de solutos como o caso da sacarose na cana-de-açúcar, é possível que elas possam ser selecionadas como marcadores bioquímicos de genótipos produtivos da cana-de-açúcar. Aos dois meses de idade, os três genótipos estudados não apresentaram diferenças significativas na atividade de hidrólise de ATP e PP<sub>i</sub> (Figuras 10, 11 e 12). Todavia, a atividade de transporte de  $H^+$  foi maior nos híbridos RB758540 e RB855536 (Tabela 5) e conseqüentemente, estas variedades também apresentaram um maior acoplamento enzimático quando comparadas ao controle, *S. spontaneum* (Tabela 6). Nos híbridos interespecíficos o incremento na atividade da P-ATPases foi acompanhado pelo aumento na expressão desta enzima (Figura 13).

Os tecidos jovens de armazenamento (colmo jovem) caracterizam-se pela intensa expansão celular. Como nenhuma diferença significativa foi observada no metabolismo de açúcares aos dois meses de idade, sugere-se que a maior atividade das bombas de  $H^+$  no colmo dos híbridos possa estar relacionada com o maior crescimento expresso em termos de maior diâmetro do colmo e massa fresca das variedades RB758540 e da RB855536 (Tabela 2). A  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática além de gerar gradiente eletroquímico necessário ao transporte de íons e solutos através das membranas, controla funções importantes para o crescimento

vegetal, tais como alongação e divisão celular (Serrano, 1989), regulação do pH intracelular, tolerância a estresse (Palmegren, 1991; Morsomme e Boutry, 2000; Sondergaard et al., 2004). A maior expressão de RNA mensageiro ou concentração da proteína H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática foi relatada em tecidos e tipos celulares em que ocorrem altas taxas de troca de solutos através da membrana e requerem elevados níveis de energização através de bombeamento de H<sup>+</sup>, tais como, células-guarda, epiderme radicular, xilema, floema, células do parênquima (Michelet e Boutry, 1995; Morsomme e Boutry, 2000; Palmagren, 2001; Gaxiola, 2007). Atividade da P-ATPase é fortemente controlada (Duby e Boutry, 2009). Como este controle se desenrola, particularmente em relação ao crescimento, ainda não é claro, porém, sugere-se que esta enzima possa afetar o crescimento por meio de dois processos básicos: energização de absorção de nutrientes, especialmente de potássio, através da membrana plasmática, e estimulação da extensão da parede celular através do crescimento ácido (Rayle e Cleland, 1992; Lüthen et al., 1990).

O estoque e a remobilização da sacarose exigem energia para manter a troca dinâmica de metabólitos entre o vacúolo e o citoplasma. Esta energia é suprida pelas bombas de H<sup>+</sup> vacuolares (V-ATPase e a H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase) (Rea e Sanders, 1987; Maeshima, 2000), que nos híbridos com alto potencial para acumular sacarose estão mais ativas gerando um maior gradiente eletroquímico que o apresentado pela *S. spontaneum* (Tabela 5). A ativação no transporte de H<sup>+</sup> (Tabela 5) e a maior eficiência de acoplamento da H<sup>+</sup>-pirofosfatase (Tabela 6) foram acompanhadas pelo aumento no conteúdo desta enzima nos híbridos interespecíficos (Figura 15), características que podem ter sido naturalmente selecionadas nos programas de melhoramento genético desta espécie. Segundo Park et al. (2005), a superexpressão do gene desta enzima (AVP1) de *Arabidopsis*, em plantas de tomate, acarretou o aumento da biomassa radicular. O mesmo ocorreu em plantas de algodão que por consequência apresentaram aumentos na produção de fibras (Pasapula et al., 2010).

Diferente da P-ATPase e da H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase, a V-ATPase não apresentou uma correlação positiva entre atividade e expressão. A expressão da subunidade B foi maior na espécie selvagem (Figura 14). Duas hipóteses foram levantadas: uma sugere maior eficiência desta enzima nos híbridos interespecíficos, uma vez que sendo menor seu conteúdo, estas variedades conseguem manter uma atividade superior à observada na

espécie selvagem. Outra hipótese é que por ser a V-ATPase uma enzima complexa formada por múltiplas subunidades, os dados de expressão unicamente referentes à subunidade B não representam a expressão funcional real desta enzima. No entanto, outras subunidades podem apresentar maior expressão nos híbridos mais produtivos. Além disto, outros estudos têm mostrado que subunidades isoladas da V-ATPase podem ter funções adicionais independentes do bombeamento de  $H^+$ . Segundo Peters et al. (2001), as subunidades do domínio integral da membrana ( $V_0$ ) podem estar relacionadas à fusão de vesículas a membrana de leveduras. Hiesinger et al. (2005) também mostraram a importância deste domínio para a fusão das vesículas sinápticas em *Drosophila*. Em mamíferos, a subunidade a da V-ATPase foi identificada como um sensor de pH que é capaz de comunicar pH luminal a proteínas citosólicas (Hurtado-Lorenzo et al., 2006). Outros resultados obtidos com *Arabidopsis* mostraram que a subunidade VHA-B1 foi identificada em complexos com hexoquinase nucleares e o fenótipo mutante *avha-B1* indica que esta subunidade está envolvida na sinalização de glicose (Cho et al. 2006). Outras subunidades também podem apresentar dupla função na célula, o que aumenta ainda mais a complexidade desta enzima (Gaxiola, 2007).

Durante os estágios iniciais de desenvolvimento os três genótipos estudados apresentaram uma menor eficiência no acoplamento das  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ases, quando comparadas às  $H^+$ -ATPases (Tabela 6). Estes resultados dão indícios de que a  $H^+$ -pirofosfatase esteja atuando em uma conformação desacoplada com o objetivo principal de reciclar o PP<sub>i</sub> citosólico. Estes resultados têm sido interpretados com base nos trabalhos recentes de Ferjani et al. (2011; 2012), que têm demonstrado um importante papel da  $H^+$ -pirofosfatase para remoção do PP<sub>i</sub> citosólico durante os estágios iniciais do desenvolvimento vegetal.

Nas plantas com doze meses de idade não foram observadas diferenças significativas na atividade de hidrólise de ATP e PP<sub>i</sub> (Figura 16, 17 e 18) e no transporte de  $H^+$  no colmo da *S. spontaneum* e dos híbridos interespecíficos (Tabela 7). Por outro lado, as análises de acoplamento enzimático mostraram que a P-ATPase foi mais eficiente no colmo da RB855536 (Tabela 8), que tem sido caracterizada como a variedade com maior conteúdo de açúcares totais dentre os genótipos selecionados durante o estágio de maturação (Ferreira, 2009). Com relação à eficiência das bombas vacuolares, a  $H^+$ -pirofosfatase apresentou maior taxa de acoplamento nas duas

variedades com alto potencial para acumular sacarose, no entanto, o acoplamento da V-ATPase não diferiu entre os genótipos (Tabela 8). No tecido da casca, as diferenças foram mais proeminentes entre a espécie selvagem e os híbridos interespecíficos. *S. spontaneum* apresentou maior atividade de hidrólise de  $PP_i$  (Figura 18), mas quando avaliado o transporte de  $H^+$ , RB758540 e RB855536, apresentaram maior  $V_0$  e  $\Delta F_{m\acute{a}x}$  (Tabela 7), bem como uma maior eficiência no acoplamento das bombas eletrogênicas (Tabela 8), que foi acompanhado pelo aumento da quantidade destas proteínas neste tecido (Figuras 19, 20 e 21). Estas diferenças observadas no tecido da casca podem estar relacionadas ao maior acúmulo de açúcares na maturação das variedades melhoradas. Além de indicar que este tecido possa ter participação diferencial no metabolismo de açúcares na cana-de-açúcar.

A importância da casca para a produtividade da cana-de-açúcar também foi demonstrada pela maior atividade das bombas de  $H^+$  em relação ao colmo (Figura 16, 17 e 18; Tabela 7). Esta resposta ocorreu tanto na *S. spontaneum* quanto nos híbridos interespecíficos. Estes dados vão ao encontro de resultados obtidos pelo grupo do professor Arnaldo Rocha Façanha, que através da mineração de dados realizada no banco de dados do SUCEST, mostrou a maior expressão de genes relacionados com o transporte de  $H^+$  nas células da casca em comparação com as células do colmo desprovido de casca. Ao analisar a expressão de genes que codificam proteínas transportadoras de  $H^+$  da cana-de-açúcar através da análise *in silico* foi possível observar que a mineração de dados em bancos de genoma pode ser muito útil nas análises tecido-específicas, uma vez que um comportamento inesperado de alguns genes pode ser descoberto desta forma.

Além destes resultados *in silico*, outras análises mostraram que expressão de RNA mensageiro da P-ATPase, da subunidade C da V-ATPase e a  $H^+$ - $PP_i$ ase também foi maior na casca. No entanto, nossos resultados de expressão do conteúdo proteico mostraram apenas um padrão similar para a P-ATPase (Figura 19). Estes resultados inusitados podem estar relacionados com a importância que estas proteínas podem ter sobre o crescimento celular das plantas e, em certa medida pela relação que os tecidos da casca mantêm com o ambiente externo. Outra hipótese é de que possa ocorrer a produção de fotoassimilados na superfície clorofilada deste tecido e sua translocação para os feixes vasculares adjacentes.

Com os resultados da atividade de transporte de  $H^+$  também pode-se observar um padrão diferenciado na formação do gradiente de  $H^+$  entre a espécie selvagem e dos híbridos interespecíficos nos tecidos de colmos de mudas e de plantas em estágio de produção. Nas variedades melhoradas, ocorre um equilíbrio na formação do gradiente de  $H^+$  gerados pelas  $H^+$ -ATPases e pela  $H^+$ -pirofosfatase (Tabela 5 e 7). Já na *S. spontaneum* observa-se principalmente um metabolismo dependente de ATP (Tabela 5 e 6). A formação de gradiente eletroquímico ATP dependente nesta espécie selvagem pode estar relacionada a rusticidades desta espécie, que também tem como característica alta resistência a estresses abióticos. Especula-se que sobre condições adversas esse balanço seja alterado em favor da  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase. Esta hipótese é suportada pelo fato desta enzima apresentar atividade e expressão aumentadas em condições de estresse (Colombo e Cerrana, 1993; Rea e Poole, 1993; Gaxiola et al., 2001; Gao et al., 2006; Gaxiola, 2007). Porém, estudos submetendo a *S. spontaneum* a condições adversas precisam ser realizados para averiguar esta hipótese.

A cinética Michaeliana das três principais bombas de  $H^+$  presentes na membrana plasmática e no tonoplasto também foi avaliada nos diferentes estágios de desenvolvimento (2 e 12 meses) e nos diferentes tecidos (colmo e casca) dos três genótipos de cana-de-açúcar. Apesar de pequenas diferenças, o  $K_m$  da P-ATPase no colmo jovem e adulto foi maior na *S. spontaneum*. Na casca, este resultado se inverte, e a *S. spontaneum* apresenta o menor  $K_m$  entre as variedades (Tabela 9). Considerando o  $K_m$  de uma dada enzima, como um dos principais parâmetros cinéticos identificadores desta, estes resultados poderiam sugerir que uma isoforma da enzima, com baixa afinidade por ATP, possa ser expressa especificamente no colmo da *S. spontaneum* que acumula pouco açúcar. Por outro lado, uma isoforma com maior afinidade pelo substrato seria expressa nos colmos dos híbridos interespecíficos. Na casca que parece apresentar um metabolismo ativo para síntese e acúmulo de sacarose, os híbridos também se destacam com uma menor afinidade da P-ATPase, possivelmente relacionada à síntese de açúcares redutores que possa ocorrer neste tecido e que serão translocados para os tecidos do parênquima de preenchimento. Os dados de  $K_m$  da V-ATPase (Tabela 11) e da  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase (Tabela 13), também apresentaram uma resposta similar a P-ATPase no colmo. Com exceção, do  $K_m$  da  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase do colmo adulto que não apresentou diferenças significativas (Tabela 13). No

entanto na casca, o  $K_m$  das enzimas vacuolares não apresentou um padrão de resposta (Tabela 11 e 13). A velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) das bombas de  $H^+$  também foi avaliada. As diferenças apresentadas por este parâmetro parecem estar mais associadas aos estágios de desenvolvimento desta cultura. Em geral,  $V_{m\acute{a}x}$  foi maior nos tecidos adultos, sobretudo no colmo. Porém, entre as variedades não houve muitas diferenças significativas e um padrão de respostas (Tabela 10, 12 e 14).

Em conjunto, os resultados obtidos consolidam a tese de que a verificação dos padrões de ativação das bombas de  $H^+$ , de membrana plasmática e de vacúolos, constitui um elemento chave para o entendimento dos mecanismos pelos quais a cana-de-açúcar pode acumular altas concentrações de sacarose nas células do parênquima do colmo. Além disso, a maior atividade destas enzimas nos híbridos interespecíficos sugere que estas enzimas podem servir como marcadores bioquímicos para a seleção de genótipos mais produtivos de cana e que esses marcadores poderão ser úteis para guiar futuros programas de hibridização por *design* e/ou transgenia da cana.

#### 4.7. CONCLUSÃO

- O conjunto de informações uma vez integradas, maior concentração de carbono interno, taxa fotossintética e produtividade nos híbridos interespecíficos, pode funcionar como marcador fisiológico acessório para seleção de genótipos produtivos de cana-de-açúcar efetivo ainda nos estágios iniciais de desenvolvimento.
- Da mesma forma que a maior eficiência na utilização do carbono ( $A/C_i$ ) e uma anatomia diferenciada com maior área de feixe vascular e de esclerênquima, apresentada por *S. spontaneum* em relação aos híbridos, podem ser utilizadas para selecionar genótipos com maior teor de fibras em detrimento do acúmulo de sacarose.
- A concentração de açúcares no colmo, bem como a atividade da sacarose fosfato sintase e da invertase ácida vacuolar não apresentaram diferenças significativas nos colmos dos três genótipos, aos 2 meses de idade, descartando a hipótese de uso destes sistemas enzimáticos como potenciais marcadores bioquímicos para selecionar genótipos mais produtivos de cana-de-açúcar nos estágios iniciais de desenvolvimento.
- A maior atividade de transporte de  $H^+$  e o maior acoplamento das bombas de  $H^+$  nos tecidos do colmo jovem e maduro indicam a importância destas enzimas para o processo de síntese e a acumulação de açúcares na cana-de-açúcar, principalmente nos genótipos com elevado potencial para acumular sacarose. Entre os tecidos da cana madura, a casca apresentou maior atividade das bombas de  $H^+$  sugerindo um papel chave ainda não explorado do metabolismo energético da casca no processo de acumulação de açúcares no colmo.

#### 4.8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J., Ram, S.J.(2004) Image Processing with ImageJ  
*Biophot. Internat.* 11(7): 36-42.
- Ali, A., Naz, S., Iqbal, J. (2007) Effect of different explants and media compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Pak. J. Bot.* 39: 1961-1977.
- Bolling, C., Suarez, N. (2001) The Brazilian sugar industry: Recent developments. Sugar and Sweetener. Situation & Outlook, 2001.
- Bradford, M.H., (1976) Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bull,T.A., Glasziou, K.T. The evolutionary significance of sugar accumulation in *Saccharum*. *Aust. J. Biol. Sci.*16: 737-742, 1963.
- Butterfield, M.K., DíHont, A., Berding, N. (2001) The sugarcane genome: A synthesis of current understanding, and lessons for breeding and biotechnology. *Proc. S.. Afr Sug. Technol. Ass.* 75: 1-5.
- Castleden, C.K., Aoki, N., Gillespie, V.J., MacRae, E.A., Quick, P.; Buchner, P. (2004) Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiol.*135: 1753–1764.
- Casu, R.E., Grof, C.P.L., Rae, A.L., McIntyre, C.L., Dimmock, C.M., Manners, J.M. (2003) Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed

- in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. *Plant Mol. Biol.* 52: 371-386.
- Chiou, T.Z., Bush, D.R. (1996) Molecular cloning, immunochemical localization to the vacuole, and expression in transgenic yeast and tobacco of a putative sugar transporter from sugar beet. *Plant Physiol.* 110: 511-520.
- Cho, Y.H., Yoo, S.D., Sheen, J. (2006) Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell* 127: 579–589.
- Colombo, R., Cerana, R. (1993) Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatase in NaCl-grown cells of *Daucus carota*. *J. Plant Physiol.* 142: 226-229.
- Compainha Nacional de Abastecimento (CONAB) – Safra de 2013 - <http://www.conab.gov.br>.
- De Michelis, M.I., Spanswick, R.M. (1986) H<sup>+</sup>-pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol.* 81(2): 542-547.
- D'Hont, A., Glaszmann, J.C. (2001) Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. *Proc. Int. Soc. Sugarcane. Technol.* 24: 556-559.
- Duby, G., Boutry, M. (2009) The plant plasma membrane próton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflugers Arch.* 457(3): 645-655.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Notícias. <http://www.embrapa.br/noticias>.
- Eschrich, W. (1980) Free space invertase, its possible role in phloem loading. *Ber Dtsch Bot Ges* 93: 363-378.
- Façanha, A.R., De Meis, L. (1998) Reversibility of H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>- pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiol.* 116:1487-1495, 1998.
- Ferreira, L.C.S. (2009) *Estudo da bioenergética de variedades eficientes de cana-de-açúcar (Saccharum spp.) para produção de açúcar*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF.
- Fiske C.F., Subbarow Y. (1925) The colorometric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375.

- Gao, F., Gao, Q., Duan, X.G., Yue, G.D., Yang, A.F., Zhang, J.R. (2006) Cloning of an H<sup>+</sup>-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 57: 3259-3270.
- Gaxiola, R.A., Li, J., Undurraga, S., Dang, M.L., Allen, G.J., Alper, S.L., Fink, G.R. (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 28: 11444-11449.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G., Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps. *FEBS Lett* 581: 2204-2214.
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92.
- Giannini, J.L., Brislin, D.P. (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiol.* 84: 613.
- Grof, C.P.L., Campbell, J.A. (2001) Sugarcane sucrose metabolism: scope for molecular manipulation. *Aust J Plant Physiol.* 28: 1-12.
- Grof, C.P.L., So, C.T.E., Perroux, J.M., Bonnett, G.D., Forrester, R.I. (2006) The five families of sucrose-phosphate synthase genes in *Saccharum* spp. are differentially expressed in leaves and stems. *Funct. Plant Biol.* 33: 605–610.
- Gutiérrez-Miceli, F.A., Morales-Torres, R., Jesús, E.C.Y., Rincón, R.R., Montes, M.J., Oliva, L.M.A., Dendooven, L. (2004) Effects of partial defoliation on sucrose accumulation, enzyme activity and agronomic parameters in sugarcane (*Saccharum* spp.). *J. Agro. Crop Sci.* 190: 256-261.
- Hiesinger, P.R., Fayyazuddin, A., Mehta, S.Q., Rosenmund, T., Schulze, K.L., Zhai, R.G., Verstreken, P., Cao, Y., Zhou, Y., Kunz, J. (2005) The V-ATPase V<sub>0</sub> subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*. *Cell* 121: 607-612.
- Hurtado-Lorenzo, A., Skinner, M., El Annan, J., Futai, M., Sun-Wada, G.H., Bourgoin, S., Casanova, J., Wildeman, A., Bechoua, S., Ausiello, D.A. (2006) V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat. Cell Biol.* 8: 124-136.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Comunicação social: Produção Agrícola Municipal, 2005.

- Revista eletrônica de jornalismo científico. Artigo: Melhoramento de cana-de-açúcar: marco sucro-alcooleiro no Brasil. [www.consciencia.br](http://www.consciencia.br)
- Jackson, P.A. (2005) Breeding for improved sugar content in sugarcane. *Field Crop Researc.* 92: 277-290.
- Johansen, D. A. (1940) Plant microtechnique. Mc Graw Hill, New York.
- Klein, R.R., Crafts-Brandner, S.J., Salvucci, M.E. (1993) Isolation of a cDNA clone for sucrose-phosphate synthase from spinach: developmental and diurnal expression of mRNA and protein levels and enzyme activity. *Planta* (in press).
- Komor, E. (2000) The physiology of sucrose storage in sugarcane. In 'Carbohydrate reserves in plants: synthesis and regulation'. (Eds AK Gupta, N Kaur) pp. 35-53.
- Lakshmanan, P., Geijkes, R.J., Aitken, K.S., Grof, C.L., Bonnet, G.D., Smith, G.R. (2005) Sugarcane Biotechnology: the challenges and opportunities. *In Vitro Cell and Develop. Biol.* 41: 345-363.
- Li, J., Yang, H., Peer, W.A., Richter, G., Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., Titapiwantakun, B., Undurraga, S., Khodakovskaya, M., Richards, E.L., Krizek, B., Murphy, A.S., Gilroy, S., Gaxiola, R., Lingle, S.E. (1999) Sugar metabolism during growth and development in sugarcane internodes. *Crop Sci.* 39: 480-486.
- Lunn, J.E., MacRae, E.A. (2003) New complexities in the synthesis of sucrose. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 208-214.
- Lüthen, H., Bigdon, M., Böttger, M. (1990) Re-examination of acid-growth theory of auxin action. *Plant Physiol.* 93: 931-939.
- Maeshima, M., Nakanishi, Y., Matsuura-Endo, C., Tanaka, Y. (1996) Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells. *Plant Res.* 109: 119-125.
- Maeshima, M. (2000) Vacuolar H<sup>+</sup>- pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 37-51.
- Magalhães, A.C.N. Ecofisiologia da cana-de-açúcar; aspectos do metabolismo do carbono na planta. In: Castro, P.R.C., Ferreira, S.O., Yamada, T.Y. (1987) (ed.) Ecofisiologia da produção agrícola. Piracicaba: POTAFOS, p.113-118.
- Magro, F.J., Takao, G., Camargo, P.E., Takamatsu, S.Y. (2011) Biometria em cana-de-açúcar. Universidade de São Paulo –ESALQ, Piracicaba, SP.
- Matsuoka, S., Ferro, J., Arruda, P. (2009) The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. *In Vitro Cell Develop. Biol. Plant* 45: 372-381.

- McCormick, A.J., Cramer, M.D., Watt, D.A. (2008) Regulation of photosynthesis by sugars in sugarcane leaves. *J. Plant Physiol.* 165: 1817-1829.
- Michelet, B., Boutry, M. (1995) The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.* 108: 1-6.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chemist.* 31: 426-489.
- Morsome, P., Boutry, M.T. (2000) The plant plasma membrane H<sup>(+)</sup>-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys Acta.* 1465: 1-2.
- Palmgren, M.G. (2001) Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:817-845.
- Palmgren, M.G. (1991) Regulation of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *Physiol. Plant* 83: 314-323.
- Paoliello, J.M.M. (2006) Aspectos ambientais e potencial energético no aproveitamento de resíduos da indústria sucroalcooleira. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia - UNESP.
- Park, S., Li, J., Pittman, J.K., Berkowitz, G.A., Yang, H., Undurraga, S., Morris, J., Hirschi, K.D., Gaxiola, R.A. (2005) Up-regulation of an H<sup>+</sup>-pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proc Nat Acad Sci, USA* 102: 18830-18835.
- Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., Chen, J., Qiu, X., Zhu, L., Zhang, X., Auld, D., Blumwald, E., Zhang, H., Gaxiola, R., Pavton, P. (2011) Expression of in *Arabidopsis* vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the Field conditions. *Plant Biotechnol. J.* 9: 88-99.
- Peters, C., Bayer, M.J., Buhler, S., Andersen, J.S., Mann, M., Mayer, A. (2001) Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 409: 581-588.
- Quick, W.P., Schaffer, A.A. Sucrose metabolism in sources and sinks. In: Zamski, E.; Schaffer, A.A. (1996) Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships. New York: Marcel Dekker, p.115-156.
- Rae, A.L., Jackson, M.A., Nguyen, C.H., Bonnett, G.D. (2008) Functional specialization of vacuoles in sugarcane leaf and stem. *Trop. Plant Biol.* 2: 13-22.

- Rayle, D., Cleland, R.E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99: 1271-1274.
- Rea, A.L., Jackson, M.A., Nguyen, C.H., Bonnett, G.D. (2009) Functional specialization of vacuoles in sugarcane leaf and stem. *Trop. Plant Biol.* 2: 13-22.
- Rea, P.A., Poole, R. (1993) Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* 44: 157-180.
- Rea, P.A., Sanders, D. (1987) Tonoplast energization: two H<sup>+</sup> pumps, one membrane. *Physiol. Plant* 71: 131-141.
- Retamal, C.A., Thiebaut, P., Alves, E.W. (1999) Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. *Anal. Biochem.* 268: 15-20.
- Sinclair, T.R., Tanner, C.B., Bennett, J.M. (1984) Water use efficiency in crop production. *Bioscience* 34: 40-60.
- Singh, A.K., Singh, S.N., Rao, A.K., Sharma, M.L. (2008) Spacing, nitrogen, seed rate and seed size requirement of an early maturing sugarcane variety CoS 96268 for higher productivity in calcareous soils. *Indian J. Sugarcane Technol.* 23: 28-30.
- Sondergaard, T.E., Schulz, A., Palmgren, M.G. (2004) Energization of transport processes in plant. Roles of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.* 136: 2475-2482.
- Stitt, M., Lilley, R.M.C., Gerhardt, R., Heldt, H.W. (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology* 174: 518-552.
- Sze, H., Li, X., Palmgren, M.G. (1999) Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11: 677-689.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2004) *Plant physiology*. (3.ed.) Porto Alegre: ARTMED.
- Van Handel, E. (1968) Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.* 22: 280-283.
- Van Kooten, O., Snel, J.F.H. (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosyn. Res.* 25: 147-150.
- Veiga, C.F.M. (2006) Diagnóstico da cadeia produtiva da cana-de-açúcar do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: FAERJ:SEBRAE/RJ.

- Waclawovsky, A.J., Sato, P.M., Lembke, C.G., Moore, P.H., Souza, G.M. (2010) Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotech. J.* 8:1-14.
- Wang, L.P., Jackson, P.A., Lu, X., Fan, Y.H., Foreman, J.W., Chen, X.K., Deng, H.H., Fu, C., Ma, L., Aitken, K.S. (2008) Evaluation of sugarcane x *Saccharum spontaneum* progeny for biomass composition and yield components. *Crop Science* 48: 951-961.
- Whittaker, A., Botha, F.C. (1997) Carbon Partitioning during Sucrose Accumulation in Sugarcane Internodal *Tissue*. *Plant Physiol.* 115(4): 1651-1659.
- Worrell, A.C., Bruneau, J.-M., Summerfelt, K., Boersig, M., Voelker, T.A. (1991) Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* 3: 1121-1130.
- Zhu, Y.J., Komor, E., Moore, P.H. (1997) Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiol.* 115: 609-616.

## 5. CAPÍTULO 2

### MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H<sup>+</sup> VACUOLARES NAS RESPOSTAS ADAPTATIVAS DAS ESPÉCIES *Z. mays* L. E *C. rotundus* A DEFICIÊNCIA HÍDRICA

#### RESUMO

A deficiência hídrica é uma situação que afeta a produção de muitas culturas, com impactos muito negativos sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas. O vacúolo é fundamental para os mecanismos de tolerância à seca, inclusive para a manutenção da homeostase iônica e do turgor celular, que são parcialmente controlados pelas bombas de H<sup>+</sup> da membrana vacuolar. Estas enzimas geram um gradiente eletroquímico nesta membrana e facilitam o transporte secundário de íons e água para dentro do vacúolo. Neste trabalho buscou-se uma caracterização da V-ATPase e da H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase nos mecanismos de adaptação a seca de plantas de milho, com o intuito de comparar sua resposta com a de uma espécie resistente e invasiva de erva daninha, a tiririca. A H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar foi diferencialmente modulada nas duas espécies. No milho, a atividade de hidrólise de ATP foi reduzida ao longo do estresse e após as 24h de reirrigação a atividade foi recuperada apenas nos níveis do controle. Entretanto, o transporte de H<sup>+</sup> e a expressão foram praticamente inalterados pelo

estresse e pela reirrigação, o que indica uma menor sensibilidade da V-ATPase nesta espécie sensível à seca. Na tiririca tanto a atividade quanto a expressão da V-ATPase foram reduzidas pelo aumento da intensidade do estresse e recuperaram os níveis do controle após 24 horas de reirrigação. Estes resultados sugerem uma maior plasticidade nas respostas naturalmente desenvolvidas na erva daninha em comparação às desenvolvidas por seleção artificial no milho. Entre as bombas vacuolares, a  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase parece ser a principal enzima modulada pela deficiência hídrica nas duas espécies, com atividade inibida durante o estresse hídrico severo e uma superativação após a reirrigação das plantas. Estes resultados também apontam para desacoplamento funcional da  $H^+$ -pirofosfatase em condições de estresse, e um hiperacoplamento nos estágios de recuperação do mesmo. Em conjunto os resultados sugerem que os mecanismos de tolerância e recuperação das espécies ao estresse hídrico, envolvam uma regulação diferencial destas bombas de  $H^+$ , o que parece estar relacionado com um balanço energético específico do sistema de transporte de íons vacuolar. Em última instância, o conhecimento gerado pode servir para seleção de marcadores bioquímicos de resistência a estresse, que podem servir futuramente para dirigir programas de melhoramento vegetal.

## 5.1. INTRODUÇÃO

O estresse é uma condição fisiológica alterada causada por fatores que tendem a perturbar o equilíbrio. Entre os vários fatores limitantes da produção vegetal, o déficit hídrico ocupa posição de destaque, pois além de afetar as relações hídricas nas plantas, alterando-lhes o metabolismo, é um fenômeno que ocorre em grandes extensões de áreas cultiváveis (Nogueira et al. 2001). A redução do teor de água na planta, a diminuição do potencial hídrico foliar, a perda de turgor, o fechamento dos estômatos e a diminuição do crescimento celular constituem respostas de uma planta submetida ao estresse hídrico (Jaleel et al. 2009).

A habilidade das plantas para resistir a tal estresse é de suma importância para o desenvolvimento do agronegócio de qualquer país (Shao et al. 2008). Dessa forma, estudos de tolerância à seca podem trazer melhorias no crescimento e na produtividade de diversas culturas em regiões com limitação hídrica (Li et al. 2009). Grandes avanços em pesquisas sobre melhoramento vegetal para obtenção de genótipos tolerante a seca têm trazido resultados satisfatórios em diversas espécies, tais como milho e soja (Monneveux et al. 2006). Contudo, pouco é conhecido sobre os mecanismos fisiológicos que controlam a tolerância à deficiência hídrica (Banziger et al. 2002). As estratégias das plantas para superar o estresse hídrico, normalmente envolvem uma ação complexa relacionada à sensibilidade e à tolerância a outros estresses, o que pode variar entre as espécies (Chaves et al. 2002). Muitas plantas podem se adaptar ao estresse hídrico por meio de ajustamento osmótico. Esta

estratégia possibilita a manutenção do turgor celular e o crescimento, mesmo com baixo potencial hídrico foliar, através do acúmulo de alguns compostos como açúcares, aminoácidos, alcoóis e amônio quaternário dentro dos vacúolos (Morgan, 1984; Bray et al. 2000).

A membrana vacuolar (tonoplasto) possui duas bombas de prótons, as  $H^+$ -ATPases do tipo V e as  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ases. Estas enzimas fazem parte do sistema de transporte primário e são os principais consumidores da energia metabólica nas células vegetais. Elas acoplam a hidrólise de compostos fosfatados de alta energia (ATP e PP<sub>i</sub>) à geração de uma força próton-motora que energiza os transportadores secundários responsáveis pela nutrição e manutenção da homeostase celular (Gaxiola et al. 2007). No tonoplasto, a V-ATPase é a mais abundante bomba de prótons, sendo extraordinariamente importante para reações de osmoregulação, homeostase, armazenamento, defesa vegetal e muitas outras funções. Ela exerce um importante papel no controle do pH extra e intracelular nas células eucarióticas, que é essencial para o bom funcionamento dos processos celulares (Yao et al. 2007). A  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase vacuolar é uma bomba transportadora de prótons que tem sua atividade e/ou expressão modulados durante os mais diversos estresses ambientais. Rea e Poole (1993) citados por Maeshima (2000) relataram a importância desta enzima em células vegetais sob condição de estresse energético, exercendo função importante nas estratégias de sobrevivência de plantas expostas a condições limitantes de suprimento de ATP.

Para que as plantas consigam reagir às constantes mudanças ambientais e ao mesmo tempo mantenham o funcionamento metabólico, a atividade, a expressão e a integração das bombas que geram o gradiente de  $H^+$  através das membranas celulares devem ser altamente reguladas (Gaxiola et al. 2007). Diante disto, foi testada a hipótese de as bombas de  $H^+$  vacuolares serem moduladas diferencialmente em condições de limitação hídrica e na recuperação das plantas após suspensão do mesmo. Para tanto, nós foi utilizado como modelo de estudo a espécie cultivada milho (*Zea mays* L.) e comparados os resultados obtidos com as respostas da planta daninha tiririca (*Cyperus rotundus* L.), uma espécie rústica. A escolha destas duas espécies visa à elucidação de diferentes mecanismos de tolerância à seca, a fim de fornecer conhecimento básico

para o desenvolvimento de ferramentas para identificação de marcadores moleculares para deficiência hídrica.

## **5.2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **5.2.1. Respostas fisiológicas das plantas ao estresse hídrico**

Diferente dos animais, as plantas, que são sésseis, não conseguem fugir do ambiente, mas adaptam-se às mudanças ambientais desenvolvendo uma série de respostas bioquímicas e moleculares para sobreviver a essas condições. A base dos processos fisiológicos para essas respostas moleculares é a integração de muitos eventos em uma ampla rede de rotas de sinalização (Shao, 2008).

Estresses abióticos como a deficiência hídrica afetam frequentemente as plantas tanto em ambientes naturais quanto em sistemas agrícolas (Langridge, 2006). Neste último, o estresse torna-se um fator limitante da produção de plantas cultivadas e estima-se uma redução em menos da metade na produtividade que seria obtida nas condições ideais de crescimento (Tada, 2009). Os efeitos da seca são responsáveis por um dos principais problemas da agricultura, causando perdas de até 80% nas lavouras do Brasil, acarretando não só a perda da produtividade, mas também constantes migrações das culturas. A busca de alternativas para conter os problemas causados por esse estresse ambiental é considerada um dos grandes desafios do agronegócio nacional (Amaral, 2003).

A resposta das plantas à deficiência hídrica depende inteiramente do tempo de exposição da planta ao estresse, da taxa de perda de água, bem como, do instante em que ele ocorre. Sendo um estresse físico, a seca induz respostas bioquímicas através de uma cascata de processos que inclui mecanismos de sensibilidade ao estresse,

modulação dos sinais externos para sinais celulares, transdução desses sinais para o núcleo, controle transcricional e interação dos genes induzidos pelo estresse, permitindo as respostas de tolerância à deficiência hídrica (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

A divisão e a expansão celular são diretamente inibidas pelo estresse hídrico. O crescimento retardado tem sido sugerido como uma característica adaptativa da planta para sobreviver sob condições de estresse, permitindo que a planta desvie seu assimilado e sua energia, que seriam utilizados para disparar o crescimento, em moléculas de proteção para combater o estresse e/ou para manter o crescimento radicular, melhorando a aquisição de água (Zhu, 2002). Sabe-se que um dos principais efeitos da redução na disponibilidade de água no solo é a redução da fixação de carbono da folha em razão do fechamento estomático. Em nível de toda planta, a absorção de carbono total é ainda mais reduzida devido à concomitante, ou mesmo anterior, inibição do crescimento (Chaves et al. 2002).

Davies e Zhang (1991) sugerem que há evidências de sinais químicos das raízes agindo diretamente na dinâmica dos estômatos em condições de seca. Pimentel e Rossiello (1995) afirmaram que um ligeiro ressecamento do solo, mesmo que não afete as relações hídricas da parte aérea, causa um aumento na concentração de ácido abscísico (ABA) no xilema, provavelmente produzido na coifa das raízes, levando ao fechamento estomático e à diminuição da expansão celular. A seca promove uma rápida redistribuição e acumulação de ABA nos tecidos da planta; assim, de acordo com Tuberosa et al. (1994), ocorre um aumento na concentração de ABA no apoplasto das células-guarda, reduzindo a condutância estomática.

De acordo com Costa et al. (2003), condições extremas de estresse ambiental, como por exemplo seca severa, também podem afetar a membrana dos tilacoides. Nesse caso, a eficiência da fotossíntese é comprometida pela inativação do PSII e, conseqüentemente, pela inativação da cadeia de transporte de elétrons responsáveis por originar o ATP e o NADPH<sub>2</sub>. Ressalta-se que ambas as moléculas são fundamentais no ciclo de Calvin para o processo de fixação do carbono atmosférico (CO<sub>2</sub>).

Uma típica resposta de tolerância à seca em plantas é o ajustamento osmótico, que é usualmente acompanhado pela absorção de íons inorgânicos, bem como pela

acumulação de solutos orgânicos compatíveis (osmoreguladores) (Strange, 2004). Íons inorgânicos são sequestrados no vacúolo, enquanto os solutos orgânicos são compartimentalizados no citoplasma, para balancear o baixo potencial osmótico nos vacúolos (Taiz e Zeigler, 2004). A função primordial dos osmoreguladores ou solutos compatíveis é de manter o turgor celular e seus condutores de gradiente para captação de água.

### **5.2.2. Bombas de H<sup>+</sup> vacuolares e sua relação com estresses ambientais**

O vacúolo constitui de 40 a 90% do volume intracelular em uma célula vegetal, e juntamente com o citosol, gera o turgor responsável pelo crescimento e a rigidez desses organismos. O turgor celular depende da atividade das bombas de H<sup>+</sup> vacuolares (V-ATPase e H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase), que mantêm o gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup> através do tonoplasto, o qual possibilita o transporte ativo secundário de íons inorgânicos, ácidos orgânicos, açúcares e outros componentes (Ratajczak, 2000; Dietz et al. 2001). Muitos trabalhos descritos na literatura avaliam a influência de estresses ambientais sobre a atividade e expressão das bombas de H<sup>+</sup>. Entretanto, poucos deles avaliam o efeito do estresse hídrico nas bombas de H<sup>+</sup>. Por outro lado, o estresse salino talvez seja o mais estudado e pode fornecer informações importantes sobre a regulação das bombas, uma vez que salinidade e deficiência hídrica possuem íntima relação e mecanismos comuns de respostas.

Na membrana do vacúolo, a V-ATPase compõe de 6,5 a 35% do total de proteínas desta membrana em diferentes espécies de vegetais (Klink et al. 1990; Fischer-Schliebs et al. 1997). E como esta organela apresenta função essencial na manutenção do metabolismo celular devido à sua capacidade de armazenar íons tóxicos, e na homeostase do Ca, é esperado que a V-ATPase seja modulada em resposta a alterações ambientais e metabólicas (Ratajczak, 2000). Vários estudos têm demonstrado que em situação de seca, frio e anoxia, a V-ATPase funciona como uma enzima responsiva, passando por moderadas alterações na expressão de suas subunidades, e na modulação de sua estrutura (Narasimhan et al. 1991; Löw et al. 1996; Rockel et al. 1998), sendo a sobrevivência das células fortemente dependente da manutenção ou do ajustamento da atividade dessa bomba (Dietz et al. 2001).

Narasimhan et al. (1991) relataram um incremento de 2,4 vezes nos transcritos da subunidade A (subunidade catalítica) em culturas de células de *Nicotiana tabacum* submetidas a estresse salino (NaCl). Plantas de *Mesembryanthemum crystallinum* submetidas à salinidade apresentaram um aumento na quantidade de mRNA da subunidade c (canal de prótons), enquanto que a mensagem para os transcritos das subunidades A e B permaneceram constantes (Löw et al. 1996). Rockel et al. (1998) utilizando a mesma espécie, *M. crystallinum*, também demonstraram um aumento pronunciado nos níveis de transcritos da subunidade c, mas as subunidades A e B também tiveram seus níveis de transcritos aumentados quando tratados com 400 mM de NaCl.

A H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase é a principal bomba de prótons vacuolar na maioria dos tecidos jovens. O teor desta enzima varia de acordo com as condições fisiológicas e em resposta a estresses ambientais. O mecanismo regulatório da expressão gênica da V-PP<sub>i</sub>ase e a regulação pós-traducional ainda não estão elucidados. Colombo e Cerana (1993) relataram um aumento da atividade da H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase em suspensão de células de cenoura em condição de estresse salino (NaCl) e examinando o efeito dos nutrientes minerais como, K<sup>+</sup>, NO<sup>-3</sup> e Ca<sup>2+</sup> em raiz de cenoura perceberam que as atividades de hidrólise de PP<sub>i</sub> e transporte de H<sup>+</sup> aumentam em plantas com déficit de minerais. Rea e Poole (1993) também demonstraram a importância da H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase em células de plantas sob o efeito do estresse causado pela anoxia e pelo frio, em seus trabalhos eles propuseram que a H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase pode substituir a V-ATPase sob condição de estresse energético para manter o vacúolo acidificado. Nessas condições ambientais severas, as plantas que são sensíveis a baixas temperaturas sofrem sérias injúrias pelo frio.

Gaxiola et al (2001) também demonstraram que a superexpressão da AVP1 em *Arabidopsis* resultou em plantas com aumento da tolerância ao sal e resistência à seca. O fenótipo dessas plantas tolerantes ao sal foi explicado pelo aumento da entrada de Na<sup>+</sup> no interior do vacúolo e o fenótipo relatado a seca foi originalmente atribuído ao aumento da capacidade osmorregulatória vacuolar. Estudos mais recentes também relataram que a superexpressão do gene que codifica a H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase aumentou a tolerância a seca em diferentes espécies, como por exemplo em *Arabidopsis* (Brini et

al. 2007) em tabaco (Gao et al. 2006), em milho (Li et al. 2008) e em algodão (Lv et al. 2009; Pasapula et al. 2011).

### **5.2.3. Modelos de estudo**

#### **5.2.3.1. *Zea mays* L.**

O milho é uma gramínea que pertence à família Poaceae (Gramineae); ao gênero *Zea*; à espécie *Zea mays* (Borém, 1999). Caracteriza-se por ser uma planta anual, robusta e ereta, com um a quatro metros de altura, que é esplendidamente construída para a produção de grãos. Mundialmente, a importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. Na realidade, o uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal, isto é, cerca de 70% no mundo. Nos Estados Unidos, cerca de 50% é destinado a esse fim, enquanto que no Brasil varia de 60 a 80%, dependendo da fonte da estimativa e de ano para ano (Peixoto, 2002).

O milho apresenta um metabolismo do carbono tipo C4. Devido ao tamanho do dreno e por apresentar características fisiológicas favoráveis no que se refere à eficiência de conversão do carbono mineral (representado pelo gás carbônico atmosférico) em compostos orgânicos como carboidratos, é uma das plantas mais eficientes na produção de grãos (Bergonci e Bergamaschi, 2002). Além disso, o milho está no grupo de espécies com maior eficiência do uso da radiação solar ou eficiência quântica (Bergamaschi et al. 2004).

O milho é uma das espécies cultivadas que, tendo atingido o mais elevado estágio de domesticação, na sua forma atual, não apresenta indicativos de que possa subsistir sem os cuidados do homem (Cerigioli, 2005). Além disto, é uma das culturas mais sensíveis à seca (Lima, 1995). De acordo com Blum (1997), a deficiência hídrica é considerada a maior causa da redução na produtividade agrícola em regiões de clima tropical. A necessidade de suprimento hídrico para o pleno desenvolvimento dos vegetais decorre das múltiplas funções que a água desempenha na fisiologia das plantas, pois praticamente todos os processos metabólicos são influenciados pelo conteúdo de água celular. De acordo com Aldrich et al. (1992), dois dias de seca

durante a fase do florescimento do milho diminuem o rendimento de grãos em mais de 20%, ao passo que se o período de seca perdurar por quatro a oito dias, nesta mesma fase, as perdas podem chegar a mais de 50%. Bergamaschi et al. (2006) relataram que a ocorrência de seca durante a fase vegetativa também interfere no cultivo desta espécie, principalmente em relação ao crescimento da planta em função de decréscimos na área foliar e na biomassa. Porém, os efeitos da deficiência hídrica sobre a produção final de grãos podem ser atenuados se as condições hídricas se tornarem favoráveis ainda na fase vegetativa (Bergamaschi et al. 2006).

Um dos mecanismos de adaptação à seca no milho é o acúmulo de solutos osmoticamente ativos na célula, em relação às plantas bem hidratadas. Tal fenômeno, chamado de ajustamento osmótico, permite a manutenção da turgescência, do crescimento e da fotossíntese, sob baixos valores de potencial da água da folha (Morgan, 1984).

#### **5.2.3.2. *Cyperus rotundos* L.**

*Cyperus rotundos* L., também conhecida como tiririca pertencente à família Cyperaceae, e ao gênero *Cyperus*. Esta espécie está inserida em um grupo de plantas conhecida como daninha, e tem como características de rusticidade, grande vigor vegetativo e reprodutivo, tendo capacidade de sobreviver, crescer e reproduzir em condições extremas de ambiente, como seca, encharcamento, altas e baixas temperaturas, solos com problemas de salinidade, alcalinidade e acidez. Além disso, são resistentes a pragas e doenças; e de alguma forma elas interferem negativamente em alguma atividade humana (Fisher, 1973).

A tiririca é considerada a planta daninha mais disseminada e agressiva de todo mundo, provocando reduções quantitativas e qualitativas na produção mundial das principais culturas (Kissmann, 1997). Resultados de pesquisas mostram perdas da ordem de 89% para alho, 81% para feijão e 79% para a cultura do milho, entre outras.

Na presença de condições ambientais favoráveis, temperatura elevada e intensa luminosidade, o seu estabelecimento é rápido, devido ao intenso crescimento vegetativo e à produção de tubérculos, razões de sua vantagem competitiva com as culturas (Silva, 2001). Os tubérculos atuam como as principais unidades de dispersão, permanecendo dormentes no solo por longos períodos. Os diferentes graus de

dormência dos tubérculos causam emergência irregular, e isso contribui para a persistência dessa espécie daninha no solo (Ferreira, 2000).

Quanto às características fisiológicas, a tiririca apresenta um metabolismo fotossintético C4, altamente eficiente na conversão de energia luminosa em ATP e NADPH, que serão utilizados na conversão de CO<sub>2</sub> atmosférico em carboidratos. Para que as plantas C4 realizem com eficiência a fotossíntese, elas necessitam se desenvolver em condições de alta temperatura e luminosidade; portanto, a tiririca é pouco competitiva em condições de baixa temperatura e/ou intensidade luminosa (Freitas, 1997).

### 5.3. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo a caracterização do papel das bombas de  $H^+$  vacuolares nos mecanismos de respostas ao déficit hídrico em espécies vegetais com diferentes vias de desenvolvimento de resistência a estresses ambientais. Usando *C. rotundus*, uma erva daninha, e uma variedade de milho, como exemplares dotados de mecanismos desenvolvidos por seleção natural e artificial, respectivamente, pretende-se elucidar as atuações destes sistemas transdutores de energia nas diferenças de respostas ao estresse hídrico entre plantas rústicas e variedades cultivadas. A abordagem visa prover conhecimentos básicos para desenvolver ferramentas de suporte a programas de geração de variedades mais adaptadas e tolerantes a condições de seca.

#### 5.3.1. Objetivos específicos

- Avaliar as atividades de hidrólise de substrato e de transporte de  $H^+$  da V- $H^+$ -ATPase e da  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase em plantas de *Z. mays* submetidas à deficiência hídrica e após a re-hidratação para verificar a sensibilidade destas enzimas a seca;

- Analisar a regulação da expressão funcional da V- $H^+$ -ATPase e da  $H^+$ -PPase nas espécies *Z. mays* e *C. rotundos*, para verificar a hipótese destas enzimas estarem envolvidas nos mecanismos de tolerância a seca;

- Comparar as respostas das bombas de  $H^+$  da espécie *Z. mays* com a da planta daninha *C. rotundos* submetidas às mesmas condições de deficiência hídrica e re-hidratação, para caracterizar os mecanismos de adaptação em plantas rústicas e em espécies cultivadas.

## 5.4. METODOLOGIA

### 5.4.1. Material vegetal

Para o desenvolvimento deste trabalho foram usados como modelo de estudo a espécie cultivada *Z. mays* (variedade UENF 506-6) e a daninha *C. rotundos* para fins de comparação. Sementes de milho e tubérculos de tiririca foram plantados em vasos plásticos contendo uma mistura de 65% de areia e 35% de solo comercial e cultivados em casa de vegetação. Após 15 a 20 dias da germinação, foi suspensa a irrigação das plantas. O monitoramento do estresse hídrico foi feito por quantidade (%) de água no solo através do peso fresco comparado ao peso seco de três amostras de 25 cm<sup>3</sup> de solo, e após o estresse atingir o nível de 70% de ressecamento do solo, a irrigação foi reestabelecida e mantida constante 24 horas.

As plantas de milho foram coletadas para análises da atividade de hidrólise de substrato (ATP e PP<sub>i</sub>), atividade de transporte de H<sup>+</sup> e expressão da bombas de H<sup>+</sup> vacuolares. Já as plantas de tiririca foram utilizadas para análises da expressão das enzimas. Os demais resultados de atividade de hidrólise e de transporte de H<sup>+</sup> da planta daninha foram obtidos de trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do Professor Arnaldo Rocha Façanha e fazem parte da tese de doutorado já concluída da Dra. Michelle Guedes Catunda.

### 5.4.2. Preparação da fração microssomal

Utilizou-se uma preparação para isolar de uma só vez, partindo-se de uma só amostra, as frações de vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto. Tais

vesículas foram isoladas de pseudocaule de plantas *Z. mays* e *C. rotundos* através de centrifugação diferencial, como descrito por Giannini e Briskin (1987), com algumas alterações.

Foram coletados 10 g a 20 g de material de cada uma das espécies estudadas e estas foram homogeneizadas em meio tamponado, usando graal e pistilo. O tampão de extração é composto de sacarose 250mM, glicerol a 10%, 5 mM de DTT, 5mM EDTA, 0,4% de PVP-40, 100 mM KCl, 0,3% BSA, PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM, Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM, na relação peso do tecido/volume de tampão de 1:2. Toda manipulação foi realizada a uma temperatura de aproximadamente 4°C. O homogenato resultante foi submetido à centrifugação a 1500 x g, durante quinze minutos para remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação, agora a e 8.000 x g, por quinze minutos para remoção da fração mitocondrial. Em seguida o sobrenadante coletado foi centrifugado a 100.000 x g, por trinta minutos. O precipitado dessa centrifugação foi ressuspenso em solução tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,6) contendo glicerol a 10 %, DTT 5 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM, e EDTA 5 mM.

#### **5.4.3. Determinação da atividade ATPásica e pirofosfatásica**

Amostras da fração microssomal extraída do pseudocaule de milho foram usadas para mensurar a atividade ATPásica e pirofosfatásica. Este ensaio enzimático foi determinado colorimetricamente, segundo o método descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e finalizada com a adição de ácido tricloroacético em uma concentração final de 10 % (v/v) após 50 minutos de reação. O meio de reação é composto de Hepes-Tris pH 7,0 (para membranas vacuolares), 50 mM; MgSO<sub>4</sub> 5 mM, KCl 100 mM, ATP 1 mM ou PP<sub>i</sub> 0,1 mM e 50 µg de proteína. O inibidor concanamicina A 5 nM, específico para as ATPases do tipo V, foi usado para diferenciar a atividade desta enzima da atividade da P-ATPase. A hidrólise de PP<sub>i</sub> será aferida através de sua dependência por K<sup>+</sup>.

A proteína total contida na preparação foi dosada pelo método clássico descrito por Bradford (1976) - utilizando BSA como proteína padrão.

#### 5.4.4. Monitoramento do gradiente de H<sup>+</sup>

O gradiente de prótons foi medido na fração microsomal extraída do pseudocaulo de plantas de milho submetidas ao estresse hídrico e re-irrigação. A atividade de bombeamento de H<sup>+</sup> foi determinada como descrito por De Michaelis e Spanswick (1986), com algumas modificações propostas por Façanha e de Méis (1998), monitorando a taxa de decréscimo da fluorescência ( $\Delta F/\text{min}$ ) da sonda fluorescente metacromática, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), excitada com um feixe de comprimento de onda de 415 nm e a emissão captada a 485 nm, utilizando-se um espectrofluorímetro.

O ACMA contém um grupo amina que funciona como uma base fraca, e assumindo-se que quando não protonado tem capacidade de atravessar livremente a bicamada lipídica da membrana. A protonação da base do grupo amina limita essa capacidade de movimento transmembranar. Então a sonda distribui-se através da membrana em função da diferença de pH entre o interior e o exterior das vesículas. O meio reacional é composto de 10 mM de Tris pH 7,0, KCl 100 mM, ACMA 1,3  $\mu\text{M}$ , MgSO<sub>4</sub> 5 mM e ATP 1 mM ou PP<sub>i</sub> 0,1mM e 50  $\mu\text{g}$  de proteína. O gradiente foi dissipado com NH<sub>4</sub>Cl 1,5 mM.

#### 5.4.5. Immunoblotting

Foram aplicadas 10  $\mu\text{g}$  da fração microsomal extraídas de plantas de milho e de tiririca em Gel de SDS 12%. Após a eletroforese, foi feita a transferência para uma membrana de nitrocelulose umedecida no tampão de transferência contendo tampão de corrida sem SDS, 70 mL H<sub>2</sub>O e metanol. Após a transferência, a membrana foi deixada sob agitação em solução contendo solução de leite comercial (Molico) a 5% por 1 hora. Foram utilizados anticorpos contra a subunidade B da V-H<sup>+</sup>-ATPase e contra a H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase (anticorpos primários). Os anticorpos primários foram diluídos 1:1000 em solução de leite comercial a 3% e incubados sob agitação por 30 minutos; após esse período a placa com a membrana foi deixada na geladeira “*overnight*”. Na etapa seguinte a membrana foi lavada com leite 5% por mais 1 hora em agitação trocando a solução a cada 15 minutos.

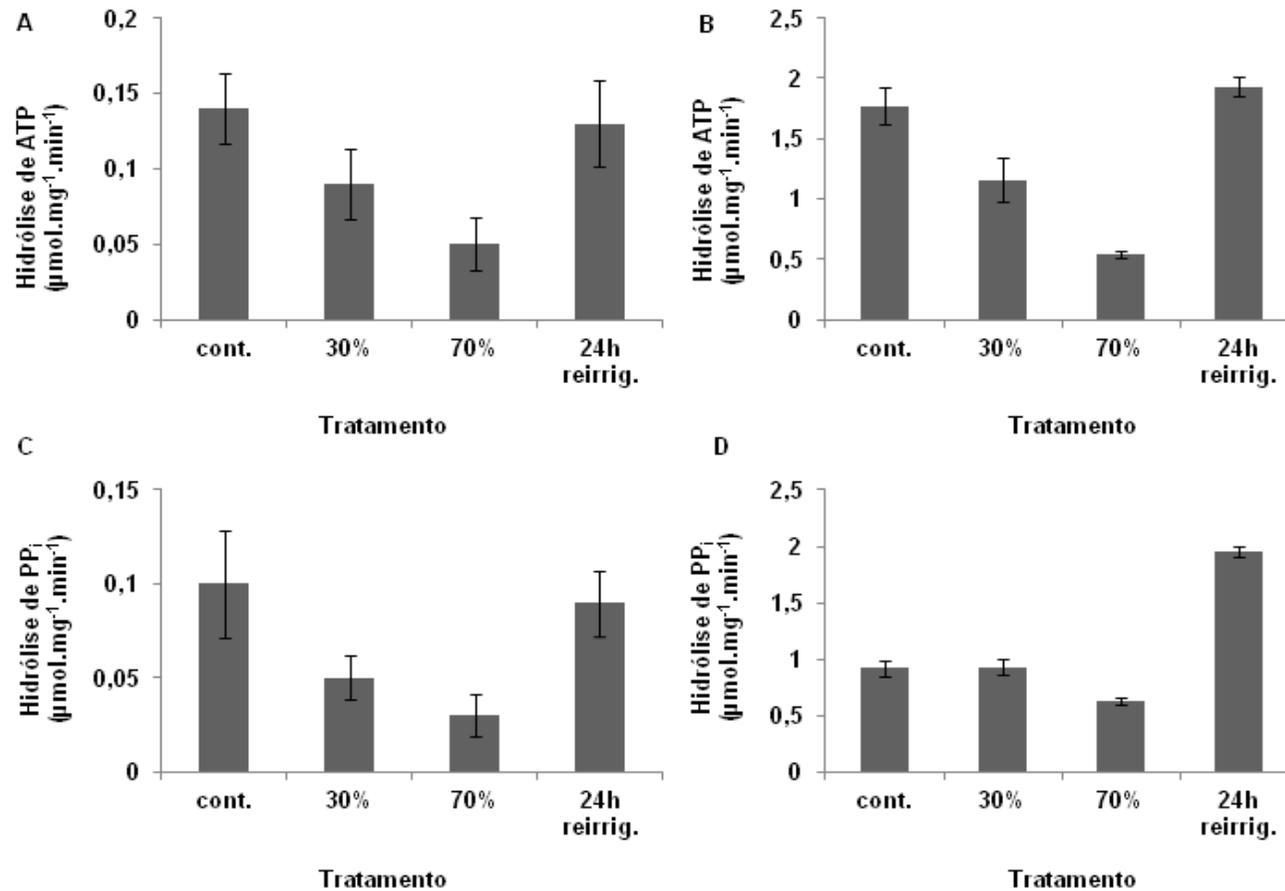
O segundo anticorpo conjugado à peroxidase foi diluído 1:1000 em solução de leite a 5% e incubado por 1 hora em agitação. Após a incubação a membrana foi

novamente lavada com solução de leite 5% em PBS 3x de 10 minutos sob agitação. Posteriormente, a membrana foi lavada com PBS 3x de 5 minutos sob agitação. Depois a membrana foi revelada em solução reveladora contendo H<sub>2</sub>O, Tris HCl 1M pH 7,5, DAB, imidazol e 30% de peróxido de hidrogênio. A membrana foi então descorada em uma placa contendo H<sub>2</sub>O e o sinal da ligação específica do anticorpo foi revelado e a imunoresposta detectada de acordo com Retamal et al. (1999).

## 5.5. RESULTADO

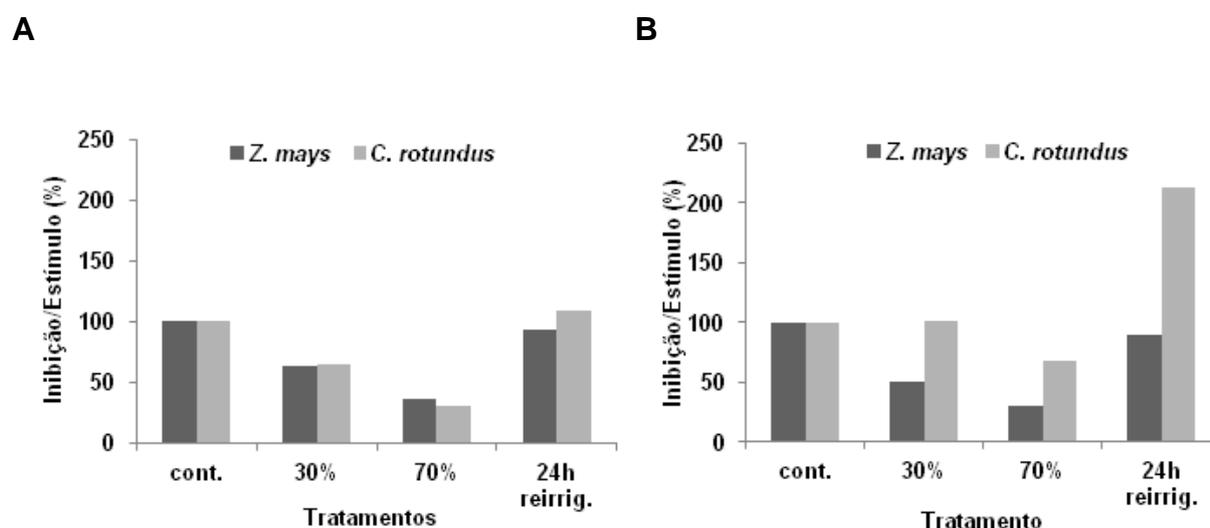
A atividade de hidrólise de substrato (ATP e  $PP_i$ ), o transporte de  $H^+$ , e a expressão da V-ATPase e da  $H^+$ - $PP_i$ ase foram analisados usando vesículas microssomais isoladas de plantas de milho submetidas a 30 e 70% de deficiência hídrica e 24 horas após a re-irrigação. Como mostrado na figura 23A, a redução de água no solo causou uma inibição progressiva na atividade de hidrólise de ATP nas plantas de milho. A atividade da V-ATPase foi inibida em 35% quando o solo atingiu 30% de ressecamento, e em 64% durante o estresse mais severo (70% de déficit hídrico). Após 24 horas de re-irrigação, a atividade de hidrólise de ATP aumentou atingindo valores próximos à atividade das plantas controle,  $0,13 \pm 0,05 \mu\text{mol } P_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (Figura 23A e 24A).

A hidrólise de  $PP_i$  mensurada nas plantas de milho submetidas à deficiência hídrica apresentou uma resposta similar à obtida pela hidrólise de ATP. No entanto, os valores apresentados na atividade pirofosfatásica foram menores que os obtidos para a atividade da V-ATPase. Quando o solo atingiu 30% de ressecamento, a atividade da  $H^+$ - $PP_i$ ase foi inibida em 50%. Durante o estresse mais severo (70% de ressecamento) a inibição foi de 70% na atividade hidrolítica (Figura 24). Após a suspensão da condição de seca, a atividade de hidrólise de  $PP_i$  nas plantas de milho foi parcialmente recuperada, atingindo os níveis próximos ao controle (Figura 23C e 24B).



**Figura 23:** Atividade de hidrólise de ATP e PP<sub>i</sub> medida em vesículas extraídas de plantas de *Z. mays* (V-ATPase – A e PP<sub>i</sub>ase – C) e *C. rotundus* (V-ATPase – B e PP<sub>i</sub>ase – D) submetidas ao estresse hídrico e após o restabelecimento da irrigação. Os valores representam a média  $\pm$  SE de três experimentos independentes.

As figuras 23 e 24 também apresentam os dados obtidos para a planta daninha tiririca submetida às mesmas condições de estresse. Os dados de atividade de hidrólise de ATP e  $PP_i$ , bem como os de transporte de  $H^+$  da planta *C. rotundus* citados neste trabalho foram obtidos de estudos anteriores do grupo do Professor Arnaldo Rocha Façanha e fazem parte da tese de doutorado, já concluída, da Dra. Michelle Guedes Catunda. Assim como o milho, a tiririca apresentou uma inibição tanto na atividade de hidrólise de ATP quanto de  $PP_i$  durante o estresse (Figura 23B e D). Entretanto, a hidrólise de ATP foi reduzida em 70% (Figura 24A), enquanto a  $H^+$ - $PP_i$ ase apresentou uma inibição de apenas 30 % (Figura 24B). Após 24 horas de re-irrigação, a hidrólise de  $PP_i$  aumentou mais de 2 vezes em relação ao controle, enquanto que a atividade de V-ATPase recuperou somente aos níveis do controle (Figura 24). Plantas de milho exibiram maior sensibilidade da atividade hidrolítica à seca e suas taxas de hidrólise de ATP e  $PP_i$  foram cerca de 10 vezes menores que as obtidas nas vesículas extraídas a partir de plantas de *C. rotundus* (Figura 23A e C).

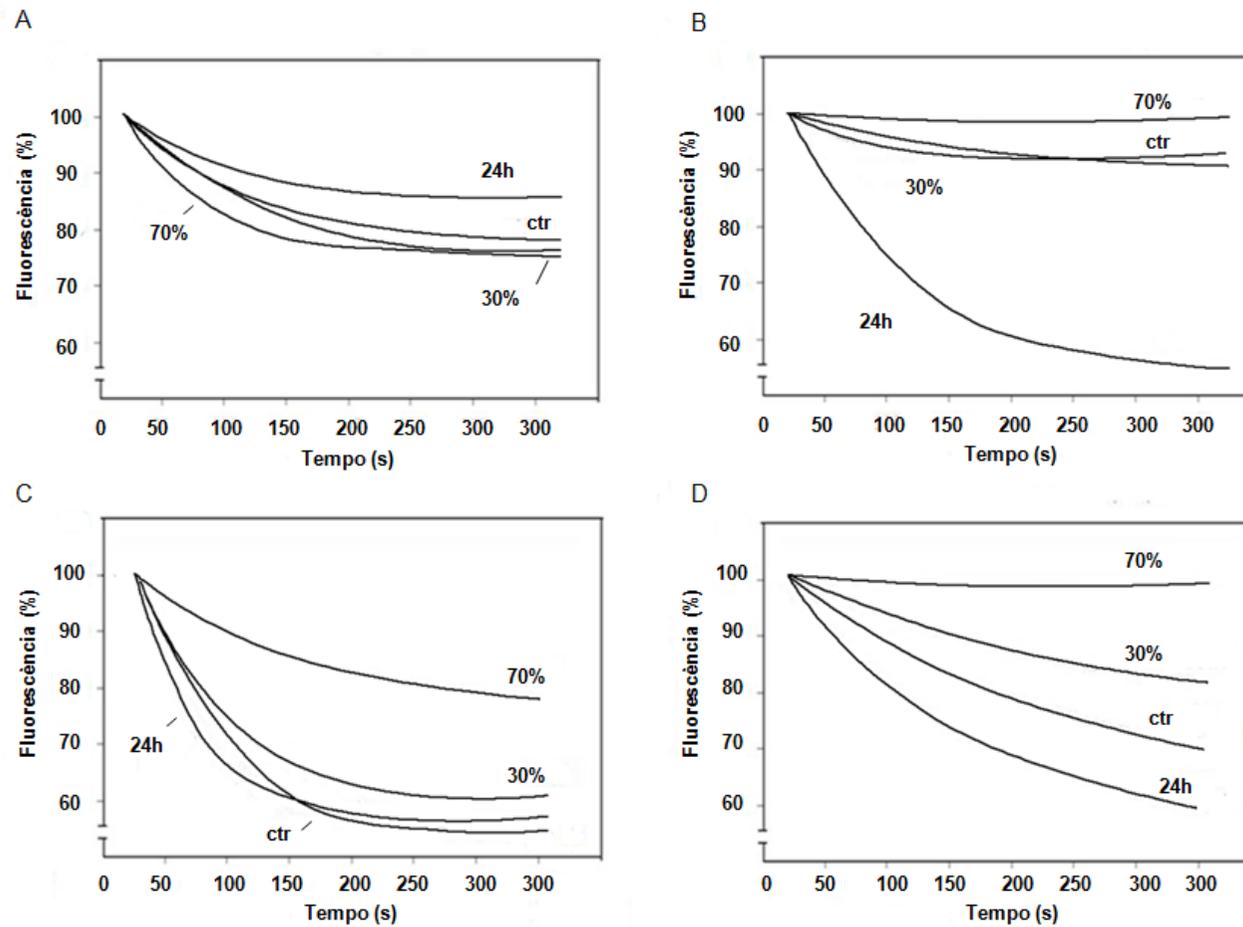


**Figura 24:** Porcentagem de inibição/estímulo na atividade de hidrólise de ATP e  $PP_i$  medida em vesículas extraídas de plantas de *Z. mays* e *C. rotundus* submetidas ao estresse hídrico e após o restabelecimento da irrigação.

Em seguida foi avaliada a atividade de transporte de  $H^+$  ( $V_0$  e  $\Delta F_{m\acute{a}x}$ ) nas plantas de milho submetidas aos tratamentos de seca e re-irrigação. O transporte de  $H^+$  mediado pela V-ATPase foi menos afetado pela deficiência hídrica que o transporte

gerado pela  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase (Figura 25A). O tratamento com 30% de seca não alterou o gradiente de  $H^+$  formado pela V-ATPase ( $\Delta F_{\text{máx}}$ ), que permaneceu igual ao das plantas controle, enquanto o tratamento com 70% de deficiência hídrica promoveu uma leve estimulação de ~17% na  $\Delta F_{\text{máx}}$  (Figura 25A). As vesículas microssomais extraídas das plantas de milho submetidas à re-irrigação apresentaram uma velocidade inicial de 12,0  $\% \cdot \text{min}^{-1}$ , valor este 1,5 vezes menor que o apresentado pelas plantas controle, 18,7  $\% \cdot \text{min}^{-1}$  (Figura 25A). O efeito da seca foi mais pronunciado na atividade de transporte de  $H^+$  dependente de PP<sub>i</sub>, que apresentou uma inibição de 34% na  $\Delta F_{\text{máx}}$  durante o estresse mais brando. Quando submetidas às condições de estresse severo não foi detectado atividade de transporte de  $H^+$  nas plantas de milho (Figura 25B). Entretanto, quando restabelecida a irrigação, as plantas de milho mostraram uma superativação da  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase, com um gradiente de  $H^+$  5 vezes maior que o controle (Figura 25B).

Na tiririca, a atividade de bombeamento de  $H^+$  gerado por ambas as bombas decresceu ao longo do estresse. O gradiente de  $H^+$  gerado pela V-ATPase foi inibido em ~60% durante o estresse severo (70%) (Figura 25C), enquanto o bombeamento de  $H^+$  dependente de PP<sub>i</sub> não foi detectado nesta condição (Figura 25D). Assim como nas plantas de milho, a gradiente de  $H^+$  gerado pela V-ATPase da tiririca não apresentou recuperação após a suspensão do estresse (Figura 25C). Por outro lado, o gradiente de  $H^+$  potássio dependente foi superativado (Figura 25D); entretanto, no milho a recuperação foi ainda maior (Figura 25B).

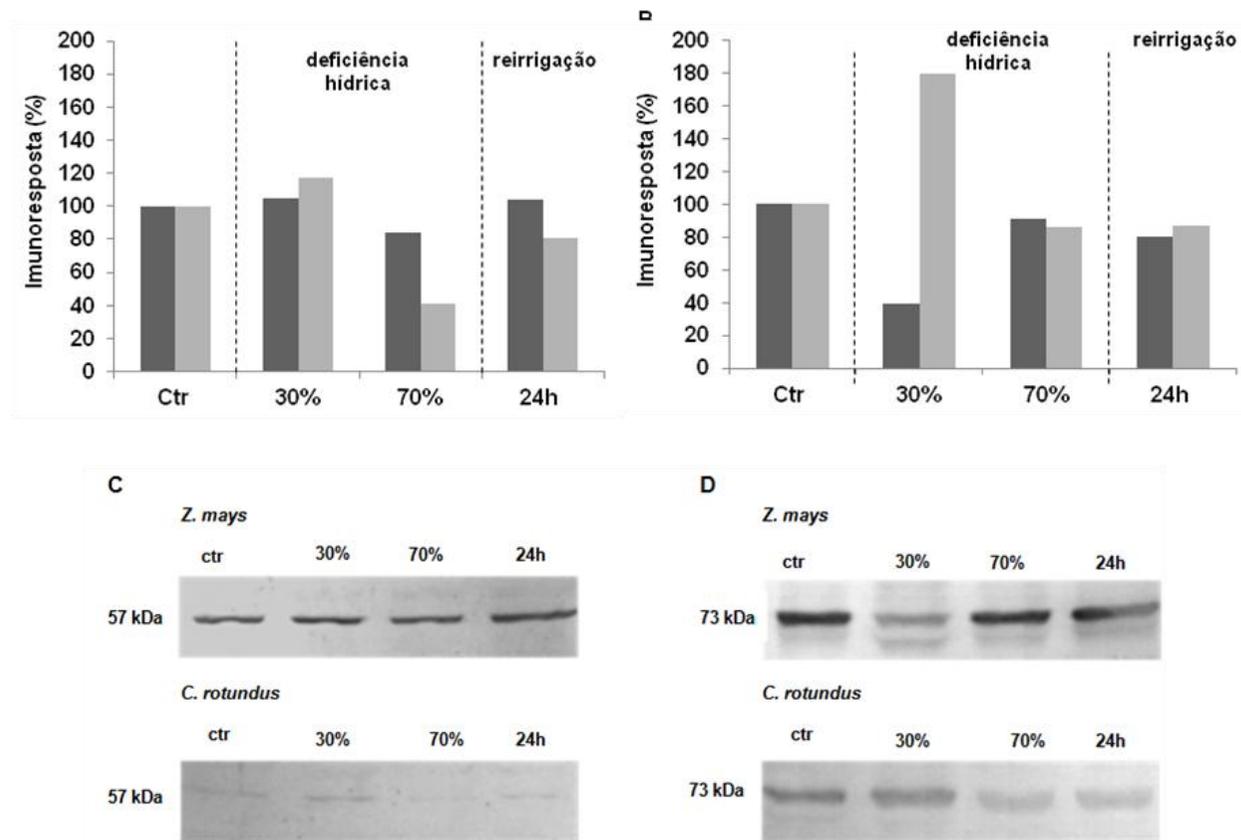


**Figura 25:** Atividade de transporte de H<sup>+</sup> mediada pela V-ATPase de milho (A) e de tiririca (B) e pela H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase de milho (C) e tiririca (D).As análises foram feitas em vesículas estraídas do pseudocolmo de plantas de milho e tiririca irrigadas diariamente, submetidas a 30% e 70% de deficiência hídrica e 24 horas de suspensão do estresse.

Para avaliar se as alterações ocorridas nas atividades de hidrólise e de transporte de  $H^+$ , das plantas de milho e de tiririca, foram decorrentes de uma regulação em nível protéico realizou-se ensaios de western blotting. Os resultados obtidos são mostrados na figura 26. O conteúdo da subunidade B da V-ATPase não foi alterado pela deficiência hídrica e pela re-irrigação no milho (Figura 26A). Já a expressão de  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase apresentou apenas uma redução quando as plantas de milho foram submetidas a 30% de deficiência hídrica (Figura 26B).

A expressão das bombas de  $H^+$  vacuolares da tiririca foi mais responsiva aos tratamentos. O conteúdo da subunidade B da V-ATPase foi estimulado em ~20% quando o solo atingiu 30% de ressecamento, e em seguida foi reduzido em ~60% no estresse mais severo (Figura 26A). A  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase teve seu conteúdo proteico aumentado em ~80% nas plantas de tiririca submetidas a 30% de deficiência hídrica. E retornou ao nível do controle quando as plantas foram tratadas com estresse mais severo e após 24h de re-irrigação (Figura 26B).

A figura 26C e D mostra as imagens da imunomarcagem das bombas de  $H^+$  vacuolares das plantas de milho e de tiririca. Como pode ser observado, o sinal detectado na marcação das vesículas microssomais de tiririca foi mais fraco que nas plantas de milho. Esta resposta pode ser consequência de uma menor reatividade dos anticorpos com as enzimas desta espécie, ainda pouco estudada.



**Figura 26:** Imunodeteção das bombas de  $H^+$  vacuolares submetidas ao estresse hídrico e à re-irrigação. As frações microsossomais foram isoladas de plantas de *Z. mays* (barras escuras) e *C. rotundus* (barras claras) como descrito na metodologia e submetidas a análises de western blots. As amostras foram usadas para quantificar o nível relativo da subunidade B da  $V-H^+$ -ATPase (A e C) e da  $H^+$ -PPase (B e D). A imunoresposta das plantas controle foi considerada 100 % em cada caso.

## 5.6. DISCUSSÃO

A distribuição e a abundância das espécies vegetais em ambientes naturais, bem como a produtividade das culturas em sistemas agrícolas são em grande parte determinadas pela disponibilidade de água no ambiente. As plantas podem responder e adaptar-se a deficiência hídrica em nível celular e bioquímico, como por exemplo, através do acúmulo de osmólitos e de proteínas envolvidas especificamente na tolerância ao estresse. O vacúolo é considerado uma organela de fundamental importância para armazenamento de metabólitos, manutenção do turgor, homeostase iônica e também para transdução de sinais nas respostas das plantas à seca (Knight et al. 1997). O transporte de íons através do tonoplasto possui papel central no controle da homeostase e osmorregulação celular. O turgor celular depende diretamente da atividade das bombas de  $H^+$  vacuolares (V-ATPase e V-PP<sub>i</sub>ase), que são responsáveis por manter o gradiente eletroquímico de  $H^+$  através do tonoplasto, o qual permite o transporte ativo secundário de íons inorgânicos, ácidos orgânicos, açúcares e outros componentes (Ratajczak, 2000; Dietz et al. 2001).

Uma vez que o estresse hídrico interfere diretamente no turgor celular e na integridade das membranas celulares nós objetivou-se avaliar as mudanças nas atividades enzimáticas e na expressão das bombas de  $H^+$  localizadas na membrana vacuolar durante adaptação de espécies cultivadas e de espécies rústicas que evoluíram em seus ambientes naturais. Para tanto, foram comparadas as respostas da espécie cultivada *Z. mays*, com a resposta da planta daninha *C. rotundos*, que apresenta características de rusticidade. Neste trabalho, *Z. mays* e *C. rotundos*

apresentaram uma inibição na atividade de hidrólise de ATP e de  $PP_i$  com o aumento na intensidade do estresse hídrico (indicado pelo aumento na porcentagem de ressecamento do solo) (Figura 23, 24 e Tabela 15), seguido pela recuperação da atividade próxima aos níveis do controle, após a liberação do estresse. Martin (2008) utilizando videiras também mostrou uma redução na atividade de hidrólise de ATP e  $PP_i$  em resposta à deficiência hídrica. No entanto, alguns trabalhos descritos na literatura mostram um incremento na atividade das bombas de  $H^+$  vacuolares sob condição de estresse abiótico, tais como estresse salino (Colombo e Cerrano, 1993; Ma et al. 2002); osmótico (Wang et al. 2001), frio e anoxia (Rea e Poole, 1993). Essas diferenças nas respostas das bombas de  $H^+$  em diferentes espécies podem ser atribuídas ao fato de que as condições de crescimento para as diversas plantas submetidas aos estresses variados são diferentes, favorecendo a variabilidade dos fenômenos celulares. Além disso, estas respostas podem ser decorrentes da capacidade de cada espécie em tolerar determinados estresses abióticos.

O transporte de  $H^+$  dependente de ATP foi pouco afetado pela seca nas plantas de milho (Figura 25A), esta resposta foi acompanhada pela menor sensibilidade na expressão da subunidade B da V-ATPase nesta espécie durante a imposição do estresse (Figura 26A). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Darley et al. (1995), que mostraram que sob condições de estresse por baixa temperatura a V-ATPase não foi afetada em plântulas de *Vigna radiata*. Em outro estudo utilizando plantas de tomateiro, uma espécie também sensível à deficiência hídrica, mostrou que o nível de RNA mensageiro para subunidade A não foi alterado pela seca (Binzel e Dunlap, 1995). Contudo, a atividade e regulação da V-ATPase parece diferir entre as espécies com diferentes capacidades para tolerar estresses ambientais. Na planta daninha, a deficiência hídrica causou a inibição no gradiente de  $H^+$  dependente de ATP (Figura 25C). Um perfil similar foi observado no ensaio de imunodeteção da subunidade B da V-ATPase da tiririca; sugerindo que este comportamento reflete uma modulação da quantidade desta enzima. Esta hipótese está em conformidade com recentes estudos que indicam que o estresse causado pelo calor e pela seca induz alterações na quantidade de transcritos e das isoformas das subunidades da V-ATPase (Hanitzsch et al. 2007). No entanto, tal regulação parece ser

característica de espécies mais adaptadas a estas condições estressantes, como *Cyperus rotundus* e *Arabidopsis thaliana* (Vartanian et al. 1994).

Entre as bombas de  $H^+$  vacuolares, a  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase mostrou ser mais sensível aos tratamentos nas duas espécies. Enquanto que o bombeamento de  $H^+$  dependente de PP<sub>i</sub> foi severamente inibido no nível severo de estresse (Figura 25B e D), a atividade hidrolítica desta enzima foi pouco afetada (Tabela 15). Duas hipóteses foram levantadas para explicar estes resultados, a primeira é de que o estresse pudesse ter causado danos à membrana vacuolar onde está inserida esta enzima. Contudo, esta hipótese foi descartada pelo fato de a V-ATPase, também localizada na membrana do tonoplasto apresentar gradiente de  $H^+$  nesta mesma condição. A outra hipótese refere-se a um desacoplamento funcional da  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase. Esta hipótese pode ser suportada por trabalhos recentes que mostram a importância desta enzima para reciclagem de PP<sub>i</sub> citosólico. Ferjani et al. (2011) utilizando o mutante *fugu5* de *Arabidopsis thaliana*, defeituoso para  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase vacuolar, demonstraram que a hidrólise de PP<sub>i</sub> é a principal função desta bomba de  $H^+$  durante o crescimento pós-embrionário de tecidos heterotróficos, e não a acidificação vacuolar como se pensava. Desta forma, sugere-se que o  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ases também possa funcionar principalmente como enzima recicladora de PP<sub>i</sub> em condições de estresse hídrico severo, submetendo-se a uma incomum e ainda pouco explorada regulação em sua conformação funcional.

A suspensão do estresse promoveu a superativação do transporte de  $H^+$  gerado pela  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase (Figura 25B e D) e o acoplamento desta enzima nas plantas de milho e tiririca. Estes resultados sugerem que a  $H^+$ -pirofosfatase parece ser a principal enzima modulada durante recuperação das plantas, porém diferente do ocorrido durante o estresse severo, a formação do gradiente de eletroquímico também é de fundamental importância para recuperação do milho e da tiririca submetidos à seca. Esta hipótese pode ser sustentada pelo fato de que após o término do estresse hídrico, que provocou um estresse energético com consequente depleção nos níveis de ATP, o substrato mais abundante presente no citosol é o PPI, que é subproduto de várias reações de biossíntese. Então, após o restabelecimento da irrigação, a atividade  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ásica superou a ATPásica. Além disso, a enzima pirofosfatase consiste de um polipeptídeo único, codificada por um único gene (Serafian et al. 1992), sendo assim sua resposta após o término do estresse com a finalidade de restabelecer o metabolismo celular,

torna-se mais rápida quando comparada a V-ATPase, uma enzima complexa de ~ 700 kDa.

Em relação às respostas adaptativas desenvolvidas entre as diferentes espécies, é importante notar que as plantas de milho apresentaram atividades hidrolíticas muito inferiores às observadas na planta daninha. Assim, parece provável que o alto desempenho das bombas de  $H^+$  seja uma característica desenvolvida pelas plantas que evoluíram em seus ambientes naturais. Nestas espécies selvagens, o gradiente eletroquímico vacuolar é mantido principalmente pela V-ATPase, enquanto a  $H^+$ -PPiase assume uma conformação desacoplada com a função de controlar a concentração de  $PP_i$  citosólico. Por outro lado, nas espécies selecionadas para o cultivo agrícola, a alta produtividade se deve, pelo menos em parte à estabilidade da V-ATPase e maior capacidade para aumentar acoplamento da  $H^+$ -PPiase, o qual torna-se responsável pela energização da membrana em condições ótimas e também na recuperação de um estresse.

Em conjunto estes resultados argumentam em favor de uma reconsideração das funções bioquímicas e fisiológicas das bombas de  $H^+$  vacuolares, com destaque para a impressionante plasticidade no acoplamento da  $H^+$ -PPiase e a sua relevância para o balanço energético nas condições de estresse, não só para o sistema vacuolar, mas para o metabolismo biossintético celular como um todo. Além disto, estas informações podem auxiliar no entendimento sobre como as plantas transgênicas que superexpressam a  $H^+$ -PPiases adquirem maior tolerância a estresses ambientais como a deficiência ao  $P_i$  (Yang et al. 2007), a seca e a salinidade e em paralelo aumentam sua produtividade (Gaxiola et al. 2001; Park et al. 2005; Guo et al. 2006; Brini et al. 2007; Pasapula et al. 2011).

Os resultados também mostram a falta de correlação entre a hidrólise de  $PP_i$ , atividade de transporte de  $H^+$  dados e a expressão sugerem uma complexa regulação da  $H^+$ -PPiase, resultados estes que argumentam contra um papel único desta enzima como sistema de backup para V-ATPases na manutenção gradiente eletroquímico vacuolar. Do ponto de vista fisiológico, isto proporciona novas perspectivas sobre a existência de duas bombas de  $H^+$  na membrana vacuolar. Este trabalho também propõe uma nova adaptação energética característica de plantas invasoras que lhes

permitam dispersar rapidamente, mesmo em áreas secas e competir com outras culturas nativas.

## 5.7. CONCLUSÃO

- A V-ATPase foi diferencialmente modulada nas espécies estudadas. No milho, o transporte de  $H^+$  e a expressão da enzima no tonoplasto foram pouco alterados pelo estresse e após a suspensão do mesmo. Enquanto, a espécie rústica (tiririca) apresentou maior plasticidade em suas respostas, com uma redução na atividade e na expressão desta enzima quando as plantas foram submetidas ao estresse, e após 24 horas de re-irrigação retornaram aos níveis de controle;
- A  $H^+$ -pirofosfatase parece ser a principal enzima modulada nas respostas das plantas às condições severas de estresse e também nos estágios de recuperação. Quando submetidas a um estresse severo, a  $H^+$ -PP<sub>i</sub>ase parece assumir uma conformação desacoplada funcionalmente caracterizada por elevadas taxas de hidrólise de substrato associada a um decaimento na capacidade de transporte de  $H^+$ . Por outro lado, nas respostas de recuperação das plantas após a liberação do estresse, esta enzima passa a assumir uma conformação hiperacoplada, caracterizada por um grande estímulo do gradiente eletroquímico não acompanhada por um estímulo equivalente na hidrólise de PP<sub>i</sub>. Respostas estas comuns às espécies rústicas e cultivadas.

## 5.8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Aldrich, S.R., Scott, W.O., Leng, E.R. (1992) *Modern corn production*. 2.ed. Champaign: A e L Publication, 371 p.
- Amaral, S.R., Lira, M.A., Tabosa, J.N. (2003) Forage sorghum lines submitted to water deficit stress under controlled conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 345-352.
- Banziger, M., Edmeades, G.O., Lafitte, H.R. (2002) Physiological mechanisms contributing to the increased N stress tolerance of tropical maize selected for drought tolerance. *Field Crops Research, Amsterdam* 75: 223-233.
- Bergamaschi, H., Dalmago, G.A., Bergonci, J.I., Bianchi, C.A.M., Müller, A.G., Comiran, F., Heckler, B.M.M. (2004) Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39(9): 831-839.
- Bergamaschi, H.; Dalmago, G. A.; Comiran, F.; Bergonci, J. I.; Müller, A. G.; França, S., Santos, A.O., Radin, B., Bianchi, C.A.M., Pereira, P.G. (2006) Déficit hídrico e produtividade na cultura do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41 (2): 243-249.
- Bergonci, J.I., Bergamaschi, H. (2002) Ecofisiologia do milho. CD-ROM dos Anais do Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 24, Florianópolis, SC, Brasil.
- Binzel, M.L., Dunlap, J.R. (1995) Abscisic acid does not mediate NaCl-induced accumulation of 70 kDa subunit tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase message in tomato. *Planta* 197: 563-568.

- Blum, A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. In: Belhassen, E. (1995) ed. Drought tolerance in higher plants. Genetical, physiological and molecular biological analysis. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 57-70.
- Borém, A. (1999) Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p.817.
- Bradford, M.H. (1976) Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G.A., Masmoudi, K. (2007) Overexpression of wheat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter TNH1 and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *J. Exp. Bot.* 58: 301-308.
- Cerigioli, M. M. (2005) *Diversidade de bactérias endolíticas de raízes de milho (Zea mays L.) e potencial para a promoção de crescimento*. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 149p.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osorio, M.L., Carvalho, I., Faria, T., Pinheiro, C. (2002) How plants cope with water stress in the field photosynthesis and growth. *Annals. Bot.* 89: 907-916.
- Colombo, R., Cerana, R. (1993) Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatase in NaCl-grown cells of *Daucus carota*. *J. Plant Physiol.* 142: 226-229.
- Costa, E.S., Bressan-Smith, R., Oliveira, J.G., Campostrini, E. (2003) Chlorophyll a fluorescence analysis in response to excitation irradiance in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp) submitted to high temperature stress. *Photosynthetica* 41:77-82.
- Darley, C.P., Davies, J.M., Sanders, D. (1995) Chill-induced changes in the activity and abundance of the vacuolar proton-pumping pyrophosphatase from Mung Bean hypocotyls. *Plant Physiol.* 109: 659-665.
- Davies, W.J., Zhang, J. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in rying soil. *Annual Reiw Plant Physiol. Mol. Biol.* 42: 55-76.

- De Michelis, M.I., Spanswick, R.M. (1986) H<sup>+</sup>-pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol.* 81(2): 542-547.
- Dietz, K.J., Tavakoli, N., Kluge, C., Mimura, T., Sharma, S.S., Harris, G.C., Chardonens, A.N., Golldack, D. (2001) Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J. Exp. Bot.* 52(363): 1961-1980.
- Façanha, A.R., De Meis L. (1998) Reversibility of H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>- pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiol.* 116:1487-1495, 1998.
- Ferjani, A., Segami, S., Horiguchi, G., Muto, Y., Maeshima, M., Tsukaya, H. (2011) Keep an eye on PPi: the vacuolar-type H<sup>+</sup>-pyrophosphatase regulates postgerminative development in Arabidopsis. *The Plant Cell* 23: 2895-2908.
- Ferreira, F.A. (2000) Manejo integrado de plantas daninhas em hortaliças. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 365-372.
- Fischer-Schliebs, E., Mariaux, J.B., Luetge, U. (1997) Stimulation of H<sup>+</sup>-transport activity of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase by activation of H<sup>+</sup>-PPase in *Lalanchoe blossfeldiana*. *Biol. Plant.* 39:169-177.
- Fisher, H.H. (1973) Conceito de erva daninha. Curso Intensivo de Controle de Ervas Daninhas, Universidade Federal de Viçosa, p. 11-15.
- Fiske C.F., Subbarow Y. (1925) The colorometric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375.
- Freitas, R.S. (1997) Efeitos do flazassulfuron e do glyphosate em aplicações única e seqüencial sobre o controle da tiririca (*Cyperus rotundus*). *Ceres* 44 (256): 597-603.
- Gao, F., Gao, Q., Duan, X.G., Yue, G.D., Yang, A.F., Zhang, J.R. (2006) Cloning of an H<sup>+</sup>-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 57: 3259-3270.
- Gaxiola, R.A., Li, J., Undurraga, S., Dang, M.L., Allen, G.J., Alper, S.L., Fink, G.R. (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 28: 11444-11449.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, G., Schumacher, K. (2007) Plant proton pump. *FEBS Letters*, 581:2204-2214.

- Giannini, J.L., Briskin, D.P. (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiol.* 84: 613.
- Guo, S., Yin, H., Zhang, X., Zhao, F., Li, P., Chen, S., Zhao, Y., Zhang, H. (2006) Molecular cloning and characterization of a vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase gene, SsVP, from the halophyte *Suaeda salsa* and its overexpression increases salt and drought tolerance of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 60: 41-50.
- Hanitzsch, M., Schnitzer, D., Seidel, T., Gollmack, D., Dietz, K.J. (2007) Transcript level regulation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase subunit isoforms VHA-a, VHA-E and VHA-G in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Membrane Biol.* 24: 507-518.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H.J., Somasundaram, R., Panneerselvam, R. (2009) Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *Intern. J. Agric. Biol.* 11: 100-105.
- Kissmann, K. G. (1997) Plantas infestantes e nocivas. 2.ed. São Paulo: BASF, 1: 825.
- Klink, R., Haschke, H.P., Kramer, D., Liittge, U. (1990) Membrane particles, proteins and ATPase activity of tonoplast vesicles of *Mesembryanthemum crystallinum* in the C3 and CAM state. *Bot. Ada* 103: 24-31.
- Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M.R. (1997) Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* 12(5): 1067-1078.
- Langridge, P., Nick, P.E., Geoff, F. (2006) Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Briefings in Funct. Gen. and Proteom.* 4: 343-354.
- Li, B., Wei, A., Song, C., Li, N., Zhang, J. (2008) Heterologous expression of the TsVP gene improves the drought resistance of maize. *Plant Biotech. J.* 6: 146-159.
- Li, Y., Sperry, J.S., Shao, M., (2009) Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. *Environ. Exp. Bot.* 66: 341-346.
- Lima, M.G. (1995) *Calibração e validação do modelo Ceres-maize em condições tropicais do BrasPiracicaba*. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP.
- Löw. R., Rausch, T. (1996) In suspension-cultured *Daucus carota* cells salt stress stimulates H<sup>+</sup>-transport but not ATP hydrolysis of the V-ATPase. *J. Exp. Bot.* 47:1725-1732.

- Lv, S.L., Lian, L.J., Tao, P.L., Li, Z.X., Zhang, K.W., Zhang, J.R. (2009) Overexpression of *Thellungiella halophila* H<sup>+</sup>-PPase (TsVP) in cotton enhances drought stress resistance of plants. *Planta* 229: 899-910.
- Ma, T., Liu, Q., Li, Z., Zhang, X. (2002) Tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase in response to salt stress in *Populus euphratica* cell suspensions. *Plant sci.*163: 499-505.
- Maeshima, M. (2000) Vacuolar H<sup>+</sup>- pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:37-51.
- Martin, A. P. (2008) Ajustamento osmótico e energética celular em videiras Cabernet Sauvignon submetidas a estresse hídrico. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF.
- Monneveux, P., Sanchez, C., Beck, D., Edmeades, G.O. (2006) Drought tolerance improvement in tropical maize source populations: evidence of progress. *Crop Sci.* 46: 180-191.
- Morgan, J.M. (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Rev. Plant Physiol.* 35: 289-319.
- Narasimhan, M.L., Binzel, M.L., Perez-Prat, E., Chen, Z., Nelsen, D.E., Singh, N.K., Bressan, R.B., Hasegawa, P.M. (1991) NaCl regulation of tonoplast ATPase 70-kilo-dalton subunit mRNA in tobacco cells. *Plant Physiol.* 97: 562-568.
- Nogueira, R.J.M.C., Moraes, J.A.P.V., Burity, H.A. (2001) Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleira submetidas a déficit de água. *Rev. Brasil. Fisiol. Veg.* 13: 75-87.
- Park, S., Li, J., Pittman, J.K., Berkowitz, G.A., Yang, H., Undurraga, S., Morris, J., Hirschi, K.D., Gaxiola, R.A. (2005) Up-regulation of an H<sup>+</sup>-pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proc Nat Acad Sci, USA* 102: 18830-18835.
- Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., Chen, J., Qiu, X., Zhu, L., Zhang, X., Auld, D., Blumwald, E., Zhang, H., Gaxiola, R., Payton, P. (2011) Expression of an Arabidopsis vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field condition. *Plant Biotech. J.* 9:88-99.

- Peixoto, P.A.S.N., Azevedo, J.L., Araújo, W.L. (2002) Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. *Biotec. Cien. Desenvol.* 29: 62-76.
- Pimentel, C., Rossiello, R.O.P., (1995) Entendimento sobre relações hídricas. Simpósio Internacional sobre Estresse Ambiental: O milho em perspectiva, Belo Horizonte: EMBRAPA/CNPMS, p. 131-146.
- Ratajczak, R. (2000) Structure, function and regulation of the plant vacuolar H<sup>+</sup>-translocating ATPase. *Biochim Biophys. Acta* 1465: 17-36.
- Rea, P.A., Poole, R. (1993) Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 157-180.
- Retamal, C.A., Thiebaut, P., Alves, E.W. (1999) Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. *Analyt. Biochem.* 268(1): 15-20.
- Rockel, B., Jia, C., Ratajczak, R., Lüttge, U. (1998) Day-night changes of the amount of subunit-c transcript of the V-ATPase in suspension cells of *Mesembryanthemum crystallinum*L. *J. Plant Physiol.* 152: 189-193.
- Serafian, V., Kim, Y., Rea, P.A. (1992) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 89: 1775-1779.
- Shao, H., Chu, L., Jaleel, C.A., Zhao, C., (2008) Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biol. Paris*, 331: 215-225.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Schinogashi, K. (1997) Molecular responses to drought and cold stress. *Plant biotech.* 7: 161-167.
- Silva, A.A. (2001) Controle de plantas daninhas. Associação Brasileira de Educação Superior – ABEAS. Curso de proteção de plantas - Modulo 3. Brasília, p. 260
- Strange, K. (2004) Cellular volume homeostasis. *Adv. Physiol. Educ.* 28: 155-159.
- Tada, Y., Takaaki, K. (2009) Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the mangrove plant, *Bruguiera gymnorhiza*. *Plant Cell Physiol.* 50(2): 439-446.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2004) Plant physiology. (3.ed.) Porto Alegre: ARTMED, p. 719.
- Tuberosa, R., Sanguineti, M. C., Landi, P. (1994) Abscisic acid concentration in leaf and xylem SAP, leaf water potential, and stomatal conductance in maize. *Crop Sci.* 34: 1537-1563.

- Vartanian, N., Marcotte, L., Ciraudat, J. (1994) Drought Rhizogenesis in *Arabidopsis thaliana*: Differential Responses of Hormonal Mutants. *Plant Physiol.* 104: 761-767.
- Wang, B., Lüttge, U., Ratajczak, R. (2001) Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *J. Exp. Bot.* 52: 2355-2365.
- Welcker, C., Boussuge, B., Bencivenni, C., Ribaut, M., Tardieu, F. (2007) Are source and sink strengths genetically linked in maize plants subjected to water deficit?: a QTL study of the responses of leaf growth and of Anthesis-Silking Interval to water deficit. *J. Exp Bot.* 58: 339-349.
- Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W.A., Silbart, L.K., Murphy, A., Gaxiola, R.A. (2007) Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots overexpressing a phosphorus-responsive type I H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Plant Biotech. J.* 5: 735-745.
- Yao, G.F., Feng, H.T., Cai, Y.L., Qi, W.L., Kong, K.M. (2007) Characterization of vacuolar-ATPase and selective inhibition of vacuolar-H(+)-ATPase in osteoclasts. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 357: 821-827.
- Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R. (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. *Planta* 225: 1583-1595.
- Zhu, J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:247-273.

## 6. CONCLUSÃO FINAL

Os dados apresentados nesta tese mostram evidências de uma modulação diferencial dos sistemas de transdução de energia entre os genótipos selvagens e os selecionados ao longo do tempo para o cultivo agrícola. Entre as espécies selvagens utilizadas como modelo de estudo, *S. spontaneum* e *C. rotundus*, o fenótipo de rusticidade pode ser em parte explicado por um metabolismo principalmente dependente de ATP, que pode ser observado pelo maior gradiente de  $H^+$  gerado pelas  $H^+$ -ATPases. Já as espécies selecionadas para agricultura, ocorre um balanço na formação do gradiente de  $H^+$  dependente de ATP e  $PP_i$ , que parece contribuir tanto para maior produtividade quanto para adaptação destas plantas às condições de estresse.