



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

HELAINÉ CRISTIANE SILVA

**EFEITOS DA MICROGRAVIDADE EM PLANTAS
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**NATAL - RN
JANEIRO – 2013**

HELAINÉ CRISTIANE SILVA

**EFEITOS DA MICROGRAVIDADE EM PLANTAS
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Katia Castanho Scortecci

**NATAL – RN
JANEIRO - 2013**

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de
Biociências

Silva, Helaine Cristiane.

Efeitos da microgravidade em plantas de cana-de-açúcar / Helaine
Cristiane Silva. – Natal, RN, 2013.

73 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Katia Castanho Scortecci.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica.

1. Cana-de-açúcar – Dissertação. 2. Saccharum spp. – Dissertação. 3.
Catalase – Dissertação. I. Scortecci, Katia Castanho. II. Universidade
Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 633.61

HELAINÉ CRISTIANE SILVA

EFEITOS DA MICROGRAVIDADE EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: 29/01/2013

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Kátia Castanho Scortecci
Departamento de Biologia Celular e Genética - UFRN
Orientadora



Prof. Dr. Tercílio Calsa Júnior
Departamento de Biologia Molecular de Plantas– UFPE
1º Examinador



Prof. Dr. João Paulo Matos Santos Lima
Departamento de Bioquímica-UFRN
2º Examinador

Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder o dom da vida e permitir que eu possa desfrutá-la ao lado de pessoas tão queridas. Como diz Esopo, “a gratidão é a virtude das almas nobres”, e, graças ao Senhor, pude contar com contribuições valorosas ao longo dessa jornada. Agradeço, também:

À minha família por fornecerem a essência para o que hoje sou;

Aos amigos que eu passei a ver menos e admirar mais ao longo desses dois anos;

Helcio e Neusa, por acreditarem na minha capacidade de driblar problemas, mesmo quando nem eu mesma acreditava;

Rafael, meu noivo, pela paciência sem fim e por todo o amor que me fazia erguer a cabeça nos momentos de dificuldades (que não foram poucos), não tenho palavras.

Minha orientadora, Professora Katia Scortecci, por confiar um trabalho tão importante em minhas mãos e por conduzir a orientação da melhor maneira possível;

A turma do mestrado em bioquímica 2011: rimos e choramos muito! Foi maravilhoso poder trocar conhecimento com pessoas tão poderosas (alguém já descobriu quem é Paola?);

Aos colegas do LBMG, sempre dispostos a compartilhar conhecimentos e boas risadas, aprendi muito com vocês; agradeço especialmente a Ana Karina, por ser uma *amiguinha* tão fiel, certamente tudo foi “menos difícil” quando você estava por perto; Amanda, por me ajudar a crescer como profissional e como pessoa; e Kellya, pelo auxílio nas análises histológicas e por ser uma companhia feliz em dias de estresse nível “*coca-cola nos colmos*”;

Ao Professor João Paulo Matos, pelas ótimas sugestões na qualificação e por abrir as portas do Laboratório de glicobiologia molecular para a realização dos ensaios enzimáticos e análises de bioinformática;

Às Professoras Adriana Uchoa e Jacira pelas preciosas contribuições no exame de qualificação;

Aos amigos que fiz e os que pude reencontrar no laboratório de Glicomol, vocês são ótimos! Um agradecimento especial a Érika e Diego, por dedicarem tanto tempo de suas vidas a esse trabalho;

Aos técnicos da UFRN, Socorro e Artejose, pela paciência e fundamental ajuda com as análises de microscopia óptica e de varredura;

Ao time da faculdade, foi ótimo poder contar com vocês.

AEB, FINEP, FAPERN, CNPQ e CAPES.

"Quando o frescor da manhã é substituído pelo cansaço do meio-dia, quando os músculos das pernas tremem sob a tensão, a subida parece não ter fim e, de repente, nada acontece como o desejamos - é então que não devemos hesitar."

Dag Hammarskjöld

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma planta da família Poaceae que possui uma impressionante capacidade de armazenar sacarose no colmo, o que a torna um componente significativo da economia de muitos países. Aproximadamente 100 países produzem cana-de-açúcar em uma área de 22 milhões de hectares no mundo. Por essas razões, diversos estudos sobre a resposta de culturas a estresse ambiental contemplam a cana-de-açúcar. Uma mudança na gravidade pode ser um tipo de estresse abiótico, uma vez que é capaz de gerar respostas rápidas após a estimulação gravitacional. No presente trabalho procurou-se investigar as possíveis alterações morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares decorrentes da microgravidade. Aqui são apresentadas as contribuições do experimento de submissão de plantas de cana-de-açúcar à microgravidade através de voo em um veículo VSB-30. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas em condições controladas, com 10 dias de desenvolvimento, foram assim submetidas a um período de seis minutos de microgravidade real. As análises morfofisiológicas de raízes e folhas mostraram que as plantas sofreram alteração nos tecidos de condução da seiva e água, padrão de disposição irregular de feixes vasculares, espessamento de paredes celulares, entre outras modificações anatômicas que indicam que a morfologia das plantas foi substancialmente influenciada pela ausência de estímulo gravitacional, além do acúmulo de peróxido de hidrogênio, importante molécula de sinalização em condições de estresse. Foi realizada a extração do RNA e o sequenciamento do RNA através da plataforma Illumina, e estas sequências estão sendo analisadas. Foram também observadas alterações nas atividades enzimáticas, com aumento na atividade de superóxido dismutase em folhas e redução da atividade de superóxido dismutase e ascorbato peroxidase em raízes. Assim, estes resultados permitem concluir que a alteração da gravidade foi percebida pelas plantas de cana-de-açúcar e o ambiente de microgravidade desencadeou alterações associadas a um processo de sinalização por meio de espécies reativas de oxigênio em condições de estresse. O presente trabalho auxiliou, portanto, a compreender como a gravidade interfere na organização estrutural das plantas, através da comparação da anatomia de plantas submetidas à microgravidade e plantas crescidas em gravidade 1g.

Palavras-chave: Anatomia, sequenciamento de RNA, sinalização, catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase, *Saccharum spp.*

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum spp.*) is a plant from Poaceae family that has an impressive ability to accumulate sucrose in the stalk, making it a significant component of the economy of many countries. About 100 countries produce sugarcane in an area of 22 million hectares worldwide. For this reason, many studies have been done using sugarcane as a plant model in order to improve production. A change in gravity may be one kind of abiotic stress, since it generates rapid responses after stimulation. In this work we decided to investigate the possible morphophysiological, biochemical and molecular changes resulting from microgravity. Here, we present the contributions of an experiment where sugarcane plants were submitted to microgravity flight using a vehicle VSB-30, a sounding rocket developed by Aeronautics and Space Institute teams, in cooperation with the German Space Agency. Sugarcane plants with 10 days older were submitted to a period of six minutes of microgravity using the VSB-30 rocket. The morphophysiological analyses of roots and leaves showed that plants submitted to the flight showed changes in the conduction tissues, irregular pattern of arrangement of vascular bundles and thickening of the cell walls, among other anatomical changes that indicate that the morphology of the plants was substantially influenced by gravitational stimulation, besides the accumulation of hydrogen peroxide, an important signaling molecule in stress conditions. We carried out RNA extraction and sequencing using Illumina platform. Plants subjected to microgravity also showed changes in enzyme activity. It was observed an increased in superoxide dismutase activity in leaves and a decreased in its activity in roots as well as for ascorbate peroxidase activity. Thus, it was concluded that the changes in gravity were perceived by plants, and that microgravity environment triggered changes associated with a reactive oxygen specie signaling process. This work has helped the understanding of how the gravity affects the structural organization of the plants, by comparing the anatomy of plants subjected to microgravity and plants grown in 1g gravity.

Key-words: anatomy, RNA sequencing, catalase, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase, *Saccharum spp.*

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Etapas de emblocamento de folhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar (SP81 3250) com 10 dias de desenvolvimento, submetidas ao voo espacial e em condições controle (crescidas em gravidade 1g).34
- Tabela 2 – Relação dos corantes utilizadas nas análises de anatomia com microscopia óptica e as substâncias evidenciadas por eles.35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: EROs e estresse oxidativo. Esquema exibindo alguns dos agentes estressantes que levam ao acúmulo das EROs e suas consequências biológicas, que provocam uma variedade de disfunções fisiológicas, podendo desencadear a morte celular (Fonte: Adaptado de Scandalios, 2005).16
- Figura 2: Cultivo das plantas. (A) Colmos com extremidades seladas com parafina e (B) Plantas de cana-de-açúcar (variedade SP81-3250) cultivadas em bandejas contendo vermiculita expandida na sala de crescimento de plantas do LBMG. (Fonte: Acervo pessoal).....25
- Figura 3: Ensaio de microgravidade. (A) Planta de cana-de-açúcar com 10 dias de desenvolvimento, medindo aproximadamente 10 centímetros (B) Caixa usinada em alumínio anodizado na qual as plantas foram acondicionadas para o voo no foguete de sondagem VSB-30 (C) Plantas na caixa a ser inserida no módulo de carga útil do foguete, fixadas a um suporte vazado com auxílio de presilhas plásticas (Fonte: Acervo pessoal).....26
- Figura 4: Foguete de sondagem VSB-30. (A) Montagem da carga útil do foguete de sondagem utilizado no lançamento do experimento contendo as plantas de cana-de-açúcar ao espaço, no Centro de Lançamento de Alcântara (MA) (B) Esquema mostrando os diferentes compartimentos da carga útil do foguete destinados à realização de experimentos embarcados no voo espacial, com destaque para o módulo do ensaio VGP de submissão de plantas de cana-de-açúcar à microgravidade (Fonte: IAE).....28
- Figura 5: Lançamento do VSB-30. Foguete VSB-30 lançado no dia 12 de dezembro de 2010, no Centro de Lançamento de Alcântara (CLA) (Fonte: IAE).29
- Figura 6: Recuperação da carga útil. (A) Técnico do IAE retirando uma das caixas contendo as plantas do ensaio de microgravidade após o resgate da carga útil. (B) Amostras sendo acondicionadas em soluções específicas para as análises posteriores (Fonte: IAE).29
- Figura 7: Ensaio de microgravidade. Etapas do ensaio de microgravidade, desde o crescimento das plantas, passando pelo lançamento no foguete, seguido da recuperação da carga útil e destinação de amostras de folhas e raízes para análises de anatomia, atividades enzimáticas e sequenciamento de RNA.30
- Figura 8: Amostras de tecidos para os diferentes ensaios. Representação esquemática das amostras utilizadas para as diferentes etapas de sequenciamento de RNA, análises das atividades enzimáticas e da anatomia das plantas, de forma a verificar os efeitos da microgravidade.31

Figura 9: Preparação de amostras para o MEV. Folhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar do ensaio de microgravidade e grupo controle fixados aos <i>stubs</i> para análise no microscópio eletrônico de varredura (Fonte: Acervo pessoal).	36
Figura 10: Controle de qualidade da extração de RNA. Resultado da extração de RNA de folhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar submetidas ao voo espacial no veículo VSB-30 fixadas em suporte específico nas orientações vertical e horizontal. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.....	40
Figura 11: Controle de qualidade da extração de RNA. Eletroferogramas gerados pelo Agilent 2100 Bioanalyzer de amostras de RNA de folhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar submetidas ao voo espacial no veículo VSB-30 fixadas em suporte específico nas orientações vertical e horizontal. O eixo y apresenta unidades de fluorescência (FU) e o eixo x, o tempo em segundos (s).	41
Figura 12: Controle de qualidade do NGS. Distribuição de valores de qualidade atribuídos às bases (phred score) de sequencias de RNA de folhas de plantas de cana-de-açúcar submetidas à microgravidade na orientação vertical.....	43
Figura 13: Controle de qualidade do NGS. Distribuição de valores de qualidade atribuídos às bases (phred score) de sequencias de RNA de folhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar submetidas à microgravidade nas orientações vertical e horizontal, folhas de plantas que passaram por um controle de vibração do foguete e folhas e raízes de plantas de grupos controles de ensaio na caixa hermeticamente fechada, sem sofrer qualquer alteração na gravidade.	44
Figura 14: Controle de qualidade do NGS. Gráficos circulares que apresentam as porcentagens de reads de alta qualidade com os dados já filtrados (verde), de baixa qualidade (vermelho) e contaminações de adaptadores (em amarelo, mas que não foi observada para os nossos dados da plataforma Illumina) de sequencias de RNA de folhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar submetidas à microgravidade nas orientações vertical e horizontal, folhas de plantas que passaram por um controle de vibração do foguete e folhas e raízes de plantas de grupos controles de ensaio na caixa hermeticamente fechada, sem sofrer qualquer alteração na gravidade.	45
Figura 15 - Folha de cana-de-açúcar em condições normais. Esquema apresentando características anatômicas de seção transversal de folha de cana-de-açúcar.	47
Figura 16 - Raiz de cana-de-açúcar em condições normais de crescimento (1g). Esquema apresentando características anatômicas de seção transversal de raiz de cana-de-açúcar.	48
Figura 17: Respostas das plantas à microgravidade: esquema apresentando os resultados encontrados após a exposição de plantas de cana-de-açúcar à condições de microgravidade através do voo em um foguete modelo VSB-30.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

- ABA** – Ácido abscísico
- AEB** – Agência Espacial Brasileira
- APX** – Ascorbato peroxidase
- AT** – Azul de toluidina
- CAT** - Catalase
- CLA** – Centro de Lançamento de Alcântara
- CONAB** – Companhia Nacional de Abastecimento
- DAB** - Diaminobenzidina
- DCTA** - Departamento de Ciência e Tecnologia Aeroespacial
- DEPC** - Dietilpirocarbonato
- DLR** – Agência Espacial Alemã
- EDTA** - Etilenodiamino tetracético disódico
- ERO** – Espécies Reativas de Oxigênio
- FAA** – Formaldeído, álcool e ácido acético
- FAB** – Força Aérea Brasileira
- FU** – Unidade de fluorescência
- g*** – Gravidade
- IAE** – Instituto de Aeronáutica e Espaço
- INPE** – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
- LBMG** – Laboratório de Biologia Molecular e Genômica
- MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura
- Mpb** – Milhões de pares de bases
- mSv** - Milisievert
- N₂** – Gás nitrogênio
- NBT** - *Nitro-blue tetrazolium*
- NGS** – Sequenciamento de nova geração (*New generation sequencing*)
- NPK** – Nitrogênio, Fósforo e Potássio
- RIN** – Número de integridade do RNA (*RNA Integrity Number*)
- SOD** – Superóxido dismutase
- VGP** – VSB-30 *Gravity Plant*
- VSB-30** – Veículo de Sondagem *Booster* – 30

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	14
1.1 – CANA DE AÇÚCAR: UMA CULTURA PRÓSPERA NO BRASIL	14
1.2 – CONDIÇÕES ADVERSAS DO AMBIENTE	15
1.3 – GRAVIDADE E ESTRESSE	17
1.4 – CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO DE MICROGRAVIDADE	21
2 – OBJETIVOS:	24
2.1 – OBJETIVO GERAL	24
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 – METODOLOGIA	25
3.1 – PROTOCOLO DE CULTIVO	25
3.2 – ENSAIOS	26
3.2.1 – Ensaio de microgravidade	26
3.2.2 – Controles de ensaio	30
3.3 – EXTRAÇÃO DE RNA	31
3.4 – SEQUENCIAMENTO DE RNA	32
3.5 – ANÁLISES ANATÔMICAS	33
3.5.1 – Processamento do material vegetal	33
3.5.2 – Montagem das lâminas e coloração	34
3.5.3 – Análise em microscopia eletrônica de varredura	35
3.6 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS	36
3.6.1 – Extração de proteínas solúveis	36
3.6.2 – Ensaio para determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD)	37
3.6.3 – Ensaio para determinação da atividade de catalase (CAT)	37
3.6.4 – Ensaio para determinação da atividade de ascorbato peroxidase (APX)	38
3.6.5 – Análises estatísticas	38
4 – RESULTADOS	39
4.1 – CANA-DE-AÇÚCAR: DA TERRA AO ESPAÇO	39
4.2 – EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE RNA	39
4.3 – ANÁLISES ANATÔMICAS	46
4.3.1 – Análises por microscopia óptica	46
4.3.2 – Análise por microscopia eletrônica de varredura	50
4.4 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS	51

4.4.1 – Superóxido dismutase (SOD)	51
4.4.2 – Catalase (CAT)	52
4.4.3 – Ascorbato peroxidase (APX)	53
5 – DISCUSSÃO	54
6 – CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – CANA DE AÇÚCAR: UMA CULTURA PRÓSPERA NO BRASIL

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é um membro da classe Monocotiledônea, ordem Poales e família Poaceae. Essa família inclui outros representantes de importância econômica, a saber: cereais, como arroz, milho, trigo e sorgo, bem como muitas culturas forrageiras. A planta objeto desse estudo acumula açúcar no colmo, possuindo uma impressionante capacidade de armazenamento de sacarose, cujos níveis podem chegar a 0,7 M em entrenós maduros - o que é uma característica rara em plantas cultivadas (MOORE, 1995). Aproximadamente 100 países produzem cana-de-açúcar em uma área de 22 milhões de hectares (aproximadamente 0,5% da área mundial usada para agricultura). No Brasil, a área cultivada com cana-de-açúcar referente à safra 2012/13 está estimada em 8,527 milhões de hectares, apresentando um crescimento de 2,1% em relação à safra passada (CONAB, 2012; FAOSTAT, 2010).

A cana-de-açúcar é uma importante fonte de alimento e energia e um significativo componente da economia de muitos países. É uma das principais culturas destinadas à produção de açúcar e etanol (CHA-UM & KIRDMANEE, 2008) e, nessa perspectiva, o Brasil se destaca no cenário mundial como o maior produtor, seguido da Índia, China e Tailândia (GRAÇA, 2009).

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum* L., que inclui híbridos derivados de quatro espécies domesticadas (*Saccharum officinarum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*) e duas espécies selvagens (*S. spontaneum* e *S. robustum*) (HUSSAIN *et al.*, 2004). Os híbridos possuem um genoma complexo, apresentando tanto poliploidia como aneuploidia, o que torna seu sequenciamento um desafio. Esses híbridos têm, em média, 100-120 cromossomos, podendo o número de cromossomos variar em cultivares comerciais. Com cerca de 760-926 Mpb, o genoma da cana-de-açúcar é duas vezes o tamanho do genoma do arroz (389 Mpb), similar ao genoma do sorgo (760 Mpb) e significativamente menor que o genoma do milho (2500 Mpb) (WACLAWOVSKY *et al.*, 2010; D'Hont e Glaszman, 2001 *apud* MENOSSI *et al.*, 2007).

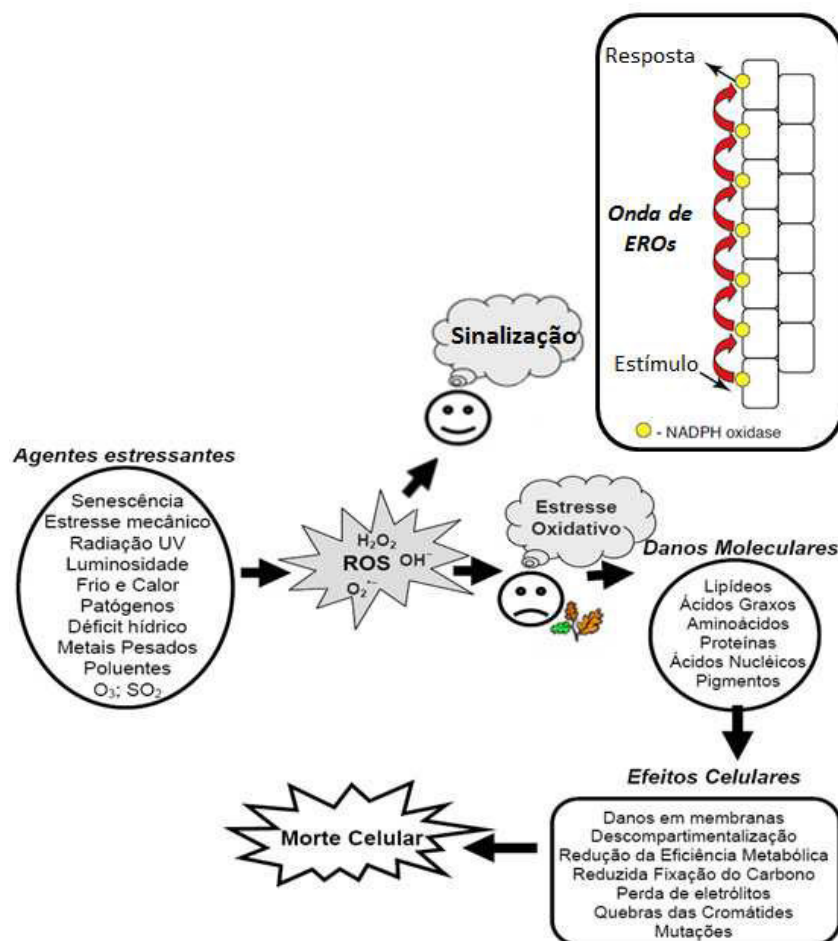
A cana-de-açúcar é uma cultura tropical e, portanto, necessita de um clima quente e úmido: sua temperatura ótima de crescimento é 35°C. As diferentes variedades cultivadas atualmente divergem marcadamente em seu crescimento sob condição de estresse abiótico. Assim, características relacionadas à resistência aos diferentes fatores de estresse são indicadores adequados para a seleção de variedades em programas de melhoramento. Uma vez que a escassez de água e diversas outras condições ambientais adversas são limitantes para as culturas, um bom entendimento de como as plantas respondem às condições adversas ambientais é importante para o melhoramento genético e aumento da produção (GRAÇA, 2009; SMIT & SINGELS, 2006; SILVA *et al.*, 2008).

1.2 – CONDIÇÕES ADVERSAS DO AMBIENTE

Diferentes agentes estressores presentes no ambiente são capazes de influenciar o desenvolvimento das plantas, por isso os vegetais apresentam um conjunto de características que viabilizam a adequação a essas condições adversas. Fatores abióticos e bióticos podem, ainda, desencadear uma situação de estresse oxidativo na planta, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos tecidos vegetais. Essas espécies podem ser geradas através do contato do oxigênio (relativamente não reativo na atmosfera) com sistemas metabólicos, dando origem a formas mais reativas, como superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e oxigênio *singlete* (GIBA *et al.*, 1998), que podem causar danos no DNA, proteínas, lipídeos e em outras biomoléculas (MITTLER *et al.*, 2004; SMIRNOFF, 1993). As EROs são produzidas em todos os organismos aeróbicos e normalmente existem na célula, em equilíbrio com moléculas antioxidantes (SCANDALIOS, 2005; GRENE, 2002).

A formação de EROs pode ser acelerada como consequência de várias condições adversas, como radiação UV, altas intensidades luminosas, exposição a herbicidas, altas temperaturas, toxinas, poluentes do ar e xenobióticos (Figura 1). O acúmulo dessas espécies reativas de oxigênio, desequilibrando o estado redox da célula, pode causar disfunções fisiológicas, lesões e morte celular (SCANDALIOS, 2005).

Figura 1: EROs: sinalização celular e estresse oxidativo. Esquema exibindo alguns dos agentes estressantes que levam ao acúmulo das EROs e suas consequências biológicas (Fonte: Adaptado de Scandalios, 2005 e Mittler *et al.*, 2011).



Como outros organismos, as plantas desenvolveram sistemas para lidar com o desbalanço causado pelo acúmulo de EROs. A primeira linha de defesa antioxidante envolve o controle da formação dessas espécies; a segunda linha de defesa consiste em um sistema de enzimas antioxidantes e compostos de baixo peso molecular que atuam na eliminação do excesso de espécies reativas, de modo a evitar lesões oxidativas em biomoléculas (NETTO, 2001).

Plantas de cana-de-açúcar em condições de estresse, portanto, podem formar EROs de forma acelerada, alterando o balanço entre essas espécies e os antioxidantes, gerando, assim, um desequilíbrio no estado redox (SINGH *et al.*, 2006; ARORA *et al.*, 2002). Entretanto, apesar da frequente associação de EROs com efeitos prejudiciais ao organismo, é importante salientar que essas espécies também são geradas nas células de plantas durante seus processos metabólicos.

EROs são moléculas de sinalização versáteis, possibilitando à planta uma propagação de sinais de forma rápida e à longas distâncias permitindo, assim, o controle de diversos processos biológicos (MITTLER *et al.*, 2011).

1.3 – GRAVIDADE E ESTRESSE

A gravidade é um dos fatores ambientais que controlam o desenvolvimento e crescimento das plantas (DARWIN, 1880). As plantas percebem a gravidade e, a partir dessa percepção, orientam seu crescimento – fenômeno denominado de gravitropismo (TOYOTA *et al.*, 2008). Diversas hipóteses foram propostas para explicar como as plantas conseguem perceber a gravidade, a exemplo da hipótese do estatólito-amido (a gravidade é sentida através da sedimentação de amiloplastos na columela) e a hipótese de Colodny-Went (a transmissão intercelular do sinal de gravidade dá-se através do movimento lateral de auxina) (KRIGES *et al.*, 2006). O citoesqueleto também pode ser um mediador da percepção da gravidade, uma vez que está em contato com organelas de alta densidade, como plastídios ou núcleo (MAIER *et al.*, 2003; KALININA, 2008). Dados sugerem que microtúbulos podem desempenhar um papel na sinalização de eventos que capacitam a planta a adaptar-se às mudanças ambientais (WASTENEYS, 2003).

O gravitropismo é o crescimento da raiz para o solo e do caule para cima, sendo este crescimento adaptativo na ancoragem da planta, na busca por água e minerais do solo e na emergência de mudas. O sensoriamento gravitacional denota um processo fisiológico envolvendo a transdução de um sinal físico – o efeito da gravidade sobre a massa – em uma forma biológica (SACK, 1991). Em plantas cultivadas, o gravitropismo contribui para utilização ótima dos recursos disponíveis e permite que as plantas prostradas pelo vento e pela chuva possam endireitar-se, o que permite a colheita mecânica, evitando danos ao produto pelo contato com a umidade ou agentes patogênicos do solo. Por outro lado, a resposta gravitrópica pode ser prejudicial para a produção hortícola, a exemplo de flores de corte, que irão desenvolver curvas indesejadas se posicionadas horizontalmente durante o transporte (PERRIN *et al.*, 2005).

Na Terra, as plantas desenvolvem-se sob influência da gravidade 1 g, a qual desencadeia vias bioquímicas que determinam a orientação de seus órgãos

(KRIEGS *et al.*, 2006). Dada a impossibilidade de produzir um ambiente livre de força gravitacional em nosso planeta, os efeitos da gravidade nos vegetais são pouco conhecidos. Experimentos utilizando clinostatos – equipamentos desenvolvidos na tentativa de compensar o efeito da aceleração da gravidade, nos quais a planta é horizontalmente orientada e girada, levemente, em torno de seu eixo principal – fornecem uma simulação da microgravidade, uma vez que expõe igualmente a planta à gravidade em todos os lados, contudo, não livra totalmente os vegetais dos efeitos gravitacionais (COOK & CROXDALE, 2003). Assim, experimentos no espaço não devem ser totalmente substituídos por aqueles realizados através de instrumentos que simulam a microgravidade (clinostatos e outros); esses equipamentos podem fornecer testes preliminares e dados para comparação com subseqüentes experiências de voo espacial (HOSHINO *et al.*, 2007).

A microgravidade muitas vezes é confundida com gravidade zero, contudo, há uma diferença entre esses dois termos: o primeiro significa um pequeno grau de gravidade (micro=pequeno), enquanto que a ausência total dessa força é que é chamada de gravidade zero. Um ambiente de microgravidade é aquele em que o peso aparente de um sistema é pequeno em relação ao seu peso real devido à gravidade (ROGERS *et al.*, 1997).

As plantas, normalmente, são submetidas a vários tipos de estresse tanto bióticos (através de interações com outros organismos) quanto abióticos (luz, temperatura, seca, umidade). A mudança na gravidade pode ser outro fator de estresse abiótico, uma vez que é capaz de desencadear respostas em casos de micro e hipergravidade (MARTZIVANOU *et al.*, 2006). Um passo em direção à compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na gravimorfogênese já foi alcançado utilizando condições de microgravidade no espaço, indicando que a morfologia das plantas é substancialmente influenciada pela estimulação gravitacional (HOSHINO *et al.*, 2007).

As vias bioquímicas geradas pela gravidade, que desencadeiam a orientação da planta, não são ainda bem conhecidas (KRIEGS *et al.*, 2006; TOYOTA *et al.*, 2008). Muitos estudos demonstraram que a concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma é afetada por estímulos ambientais (como vento, frio, seca, luz, entre

outros), modificando a atividade de muitas proteínas dependentes de cálcio. As respostas às mudanças na gravidade incluem etapas de sinalização de Ca^{2+} citosólico, como foi verificado para plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* (milho) e *Avena sativa* (aveia) (PLIETH & TREWAVAS, 2002; YOUNG & EVANS, 1994; DAYE *et al.*, 1984 *apud* TOYOTA *et al.*, 2008). Assim posto, o aumento de cálcio citosólico supracitado tem sido sugerido como um importante fator para a resposta das plantas aos estímulos gravitacionais, mas seu papel não está claro (KRIEGS *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 1999; SINCLAIR *et al.*, 1996; YOUNG & EVANS, 1994).

O regulador de crescimento auxina é frequentemente associado a respostas gravitotrópicas. Células de milho, quando estimuladas com auxina, apresentaram um aumento no Ca^{2+} citoplasmático. Protoplastos de girassol quando submetidos ao tratamento com auxina, exibiram níveis elevados de inositol 1,4,5-trifosfato – que desencadeia a liberação de Ca^{2+} . Esses dados sugerem que haja uma integração entre a resposta da auxina e o Ca^{2+} (GILROY *et al.*, 1993; KRIEGS *et al.*, 2006).

Desde a década de 1960, há um interesse na compreensão de como ocorre o desenvolvimento das espécies biológicas nas estações espaciais, uma vez que os organismos evoluíram seu desenvolvimento com a presença de uma força 1g (gravidade) (DAYANANDAN, 2011; CAMPELL *et al.*, 2001). Como os organismos percebem e respondem a estes estímulos não é totalmente compreendido e envolve uma rede complexa de cascatas de sinalização, de modo que estes organismos possam responder e adaptar-se a estas condições por meio da transcrição e tradução de genes.

Uma variedade de efeitos foi relatada através da exposição de plantas ao ambiente de microgravidade real e simulada (KRIEGS *et al.*, 2006; COOK & CROXDALE, 2003; MARTZIVANOU *et al.*, 2006; RUYTERS & FRIEDRICH, 2006). Esses estudos elucidaram a influência da microgravidade nas vias bioquímicas relacionadas ao gravitropismo (através da análise dos níveis de inositol 1,4,5-trifosfato e expressão do gene *Ran*, por exemplo), bem como verificaram que seis minutos de exposição de *Arabidopsis thaliana* à microgravidade simulada pode resultar em um aumento na expressão de genes codificantes para transportadores de amônio, arginina descarboxilase, diacilglicerol quinase, homoserina quinase,

MAP quinase, fosfolipase fosfoinositol-específica, piruvato quinase, entre outros. Os dados de pesquisas anteriores também indicaram que a microgravidade não afeta a estrutura celular de plantas de batata (COOK & CROXDALE, 2003).

Estudos prévios já demonstraram a rápida reação de plantas a estímulos de mudança de gravidade. Pereira *et al.* (1999) observaram um aumento de cinco vezes nos níveis de inositol 1,4,5-trifosfato após 10 segundos de exposição de plantas de milho à alteração gravitacional (alterando a inclinação dos recipientes de cultivo). Kriegs *et al.* (2006) constataram o aumento na expressão do gene *Ran* após 125 segundos de microgravidade real através do voo de um foguete de sondagem Texus 40.

No caso das espécies vegetais, o ambiente de microgravidade tem auxiliado na compreensão fisiológica do mecanismo de gravitropismo, entretanto, atualmente existe uma preocupação com os diversos fatores que afetam a formação de flores, produção de grãos, frutos e biomassa nessas condições. Diferentes estudos já foram realizados em missões americanas e russas na tentativa de cultivar algumas espécies de valor agrônômico. Foi obtido sucesso no crescimento de algumas espécies, enquanto que em outras culturas as plantas morrem depois de um determinado período. Tanto a germinação como o desenvolvimento destas plantas tem sido bem variável de acordo com a espécie (CAMPBELL *et al.*, 2001). Experimentos mais longos em estações espaciais não têm obtido sucesso na produção de biomassa vegetal quando comparado com os níveis obtidos na Terra. Também se observou infertilidade em algumas espécies. Campbell *et al.* (2001) cultivaram uma variedade de trigo anão na estação espacial russa Mir e observaram, inicialmente, uma redução na frequência de germinação das sementes; o crescimento foi considerado normal, entretanto estas plantas eram inférteis, isto é, apresentavam problemas na produção de grãos de pólen. Para algumas espécies foi verificado o crescimento, entretanto para outras tem sido observado problemas na formação das flores, frutos e sementes (BORODINA & TIRANEN, 2003, BULBENHEIM *et al.*, 2003; KITAYA *et al.*, 2003).

Ainda são desconhecidos os fatores que poderiam ser associados aos problemas supracitados. Alguns trabalhos utilizando células da planta modelo *Arabidopsis thaliana* vêm sendo realizados em condições de microgravidade real

e/ou simulada desde 2006 e o material tem sido analisado utilizando algumas ferramentas moleculares, como expressão diferencial e proteômica (BARJAKTAROVIC *et al.*, 2007). Esses autores observaram que as células de *Arabidopsis thaliana* perceberam as mudanças da força da gravidade como um estresse abiótico, sinalizando, assim, algumas proteínas envolvidas com a resposta das EROs. Em outro estudo, utilizando a hipergravidade, foi observado um aumento de expressão de aproximadamente 200 genes em apenas 60 minutos de exposição à hipercêntrica (MARTZIVANOU & HAMPP, 2003). Comparando-se os dados obtidos nesses dois estudos moleculares, foi encontrada uma sobreposição de nove genes envolvidos na detoxificação e metabolismo. Assim, esses trabalhos encontraram alguns sinais dessa cascata de sinalização, contudo, como esta é uma rede complexa, muitas questões devem ser esclarecidas.

Uma vez que a gravidade desempenha um importante papel no desenvolvimento e formação da planta, sua alteração desencadeará mudanças nesses processos. A influência da gravidade é facilmente perceptível em plantas, tanto na orientação da parte aérea como do sistema radicular, contudo, a maioria dos experimentos que envolvem a submissão de plantas à microgravidade real ocorre utilizando células vegetais (protoplastos) do modelo *Arabidopsis*, impossibilitando a análise de respostas dos diferentes órgãos e como eles estão integrados na percepção da microgravidade e possível adaptação dos vegetais a essa condição.

1.4 – CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO DE MICROGRAVIDADE

A composição genética atual de diversas culturas conhecidas é influenciada pelo melhoramento genético a que foram submetidas durante os séculos. Outrora considerado uma arte e sem um direcionamento científico, o melhoramento genético consistia apenas na busca por tipos mais adequados para atender às necessidades do homem. Os avanços durante o século XX, fundamentados em conhecimentos científicos que possibilitaram o desenvolvimento de ferramentas promissoras produzidas com auxílio da biologia molecular, têm permitido produções que atendem a demanda mundial por alimentos (BORÉM & MILACH, 1999).

Em virtude do clima quente e seco em nossa região, variedades cujo potencial produtivo na região Sudeste é satisfatório não são bem aproveitadas. Desse modo, a prospecção de genes associados aos diferentes fatores de estresse abiótico (como seca, salinidade, frio, calor, microgravidade, entre outros) desponta como uma poderosa ferramenta para a compreensão dos mecanismos de resistência às condições desfavoráveis, viabilizando o incremento da produtividade por meio do desenvolvimento de marcadores moleculares associados a características de interesse que possam contribuir tanto para aumentar a eficácia do melhoramento clássico (reduzindo o tempo necessário para a obtenção de variedades melhoradas), como para a obtenção de plantas transgênicas.

É incontestável a complexidade que permeia os organismos vivos, mas o avanço no conhecimento de técnicas de biologia molecular vem permitindo que muitos enigmas sejam desvendados. Técnicas como as metodologias de sequenciamento de nova geração utilizando as plataformas 454, Illumina e Solid - permitem identificar, rapidamente, conjuntos de sequências expressas de um organismo em um contexto específico. Desse modo, possibilitando correlacionar os resultados obtidos à determinada condição de estudo.

A realização da investigação de genes expressos na condição de microgravidade é de grande valor, uma vez que pode fornecer dados importantes acerca da compreensão das respostas de plantas aos diferentes tipos de estresse abiótico. Considerando que estudos utilizando células de *Arabidopsis thaliana* mostraram que esta planta identificou e respondeu às condições de microgravidade como se fosse um tipo de estresse abiótico, aumentando assim a expressão de genes especificamente associados à resposta a espécies reativas de oxigênio (BARJAKTAROVIC *et al.*, 2007; MARTZIVANOU *et al.*, 2006). Deste modo, apesar de terem sido identificados alguns genes/proteínas expressos em condições de microgravidade simulada, estes experimentos utilizaram células vegetais e não o sistema vegetal como um todo, além de ignorar o papel da parede celular nestes processos. Assim, podemos considerar que os efeitos da gravidade/microgravidade ainda não estão totalmente elucidados em sistemas vegetais. Desta forma será importante analisar os efeitos da microgravidade real em plantas de cana-de-açúcar, para avaliar respostas moleculares e morfofisiológicas dessas plantas na condição

supracitada, de modo a tentar identificar uma possível cascata de sinalização associada a esta condição de estresse abiótico, além de auxiliar no entendimento das respostas das plantas a outros tipos de restrições, provocadas por outros tipos de estresse.

Assim, essa pesquisa agrega conhecimentos relevantes para a linha de pesquisa do grupo de genética de plantas do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG), uma vez que no referido laboratório realiza-se a prospecção de genes diferencialmente expressos em plantas de cana-de-açúcar submetidas a estresse hídrico e oxidativo, além de fornecer informações que auxiliarão a compreender a ação da força da gravidade em vegetais.

2 – OBJETIVOS:

2.1 – OBJETIVO GERAL

Analisar as respostas morfofisiológicas e bioquímicas de plantas de cana-de-açúcar expostas a condições de microgravidade real.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

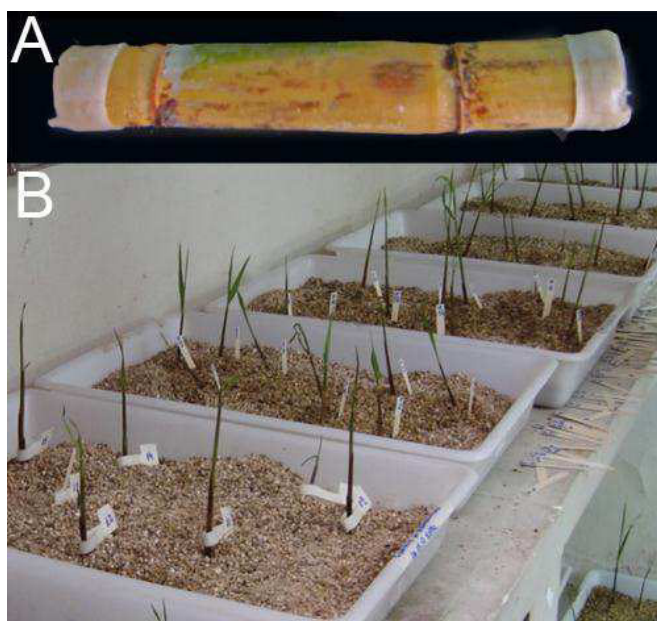
- Estabelecer um protocolo de cultivo de plantas de cana-de-açúcar em laboratório;
- Realizar experimentos em condições de microgravidade, por meio do voo de um foguete de sondagem VSB-30;
- Análise da expressão gênica através de extração e sequenciamento de RNA de plantas submetidas à microgravidade;
- Analisar alterações anatômicas das plantas controle e submetidas à condição de microgravidade por meio de análises histológicas com microscopia óptica e por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a resposta de antioxidantes enzimáticos em plantas de cana-de-açúcar em condição de microgravidade.

3 – METODOLOGIA

3.1 – PROTOCOLO DE CULTIVO

Para o desenvolvimento do protocolo de cultivo do vegetal objeto deste estudo, inicialmente foram coletadas plantas de cana-de-açúcar na Usina Estivas, localizada em Goianinha, no estado do Rio Grande do Norte (06°16'08"S e 35°12'32"W). As etapas subsequentes ocorreram na sala de cultivo de plantas do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG), nas dependências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Essas etapas contemplam o plantio das plantas de cana-de-açúcar (variedade SP81-3250), que procedeu da seguinte maneira: foram cortados colmos com duas a três gemas, os quais foram desinfetados com água e sabão, tiveram suas extremidades seladas com parafina (Figura 2A e, em seguida, foram plantados em bandejas com substrato de vermiculita expandida fina (partículas com diâmetro entre 0,15 e 8,0 mm) (Figura 2B). Além do substrato, as plantas foram fertilizadas com NPK sólido - Nitrogênio, Fósforo e Potássio na proporção de 10:10:10 - (Heringer) e crescidas sob condições de luz fluorescente branca e complementada na faixa do vermelho com lâmpadas GroLux (PAR 250 $\approx \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). A irrigação ocorreu em dias alternados e todas as plantas estiveram submetidas às mesmas condições de temperatura (23-25°C), fotoperíodo (12 horas) e umidade relativa do ar (55%-62%).

Figura 2: Cultivo das plantas. (A) Colmos com extremidades seladas com parafina e (B) Plantas de cana-de-açúcar (variedade SP81-3250) cultivadas em bandejas contendo vermiculita expandida na sala de crescimento de plantas do LBMG. (Fonte: Acervo pessoal)

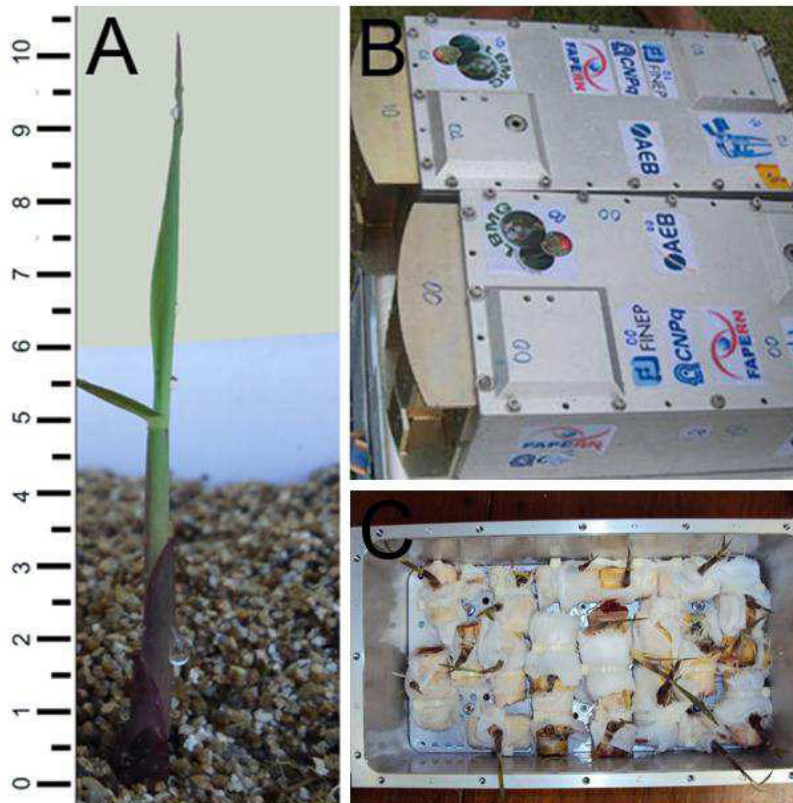


3.2 – ENSAIOS

3.2.1 – Ensaio de microgravidade

Plantas de cana-de-açúcar com 10 dias de desenvolvimento (Figura 3A) foram submetidas à condição de microgravidade através de um voo em veículo de sondagem VSB-30. Para isso, as plantas foram dispostas em duas caixas de alumínio anodizado, confeccionadas especialmente para esse experimento e equipadas com sensores e registradores de temperatura e umidade (cada caixa com dois equipamentos, de modo a garantir o monitoramento dos dados) (Figura 3B). Cada planta foi envolvida por um tecido de algodão previamente embebido em água e fixada a um suporte projetado para esse fim com auxílio de presilhas plásticas (Figura 3C). A fixação das plantas ocorreu de duas maneiras: verticalmente, em uma caixa, e horizontalmente na outra, de maneira a termos resultados considerando duas orientações para a planta.

Figura 3: Ensaio de microgravidade. (A) Planta de cana-de-açúcar com 10 dias de desenvolvimento, medindo aproximadamente 10 centímetros (B) Caixa usinada em alumínio anodizado na qual as plantas foram acondicionadas para o voo no foguete de sondagem VSB-30 (C) Plantas na caixa a ser inserida no módulo de carga útil do foguete, fixadas a um suporte vazado com auxílio de presilhas plásticas (Fonte: Acervo pessoal).

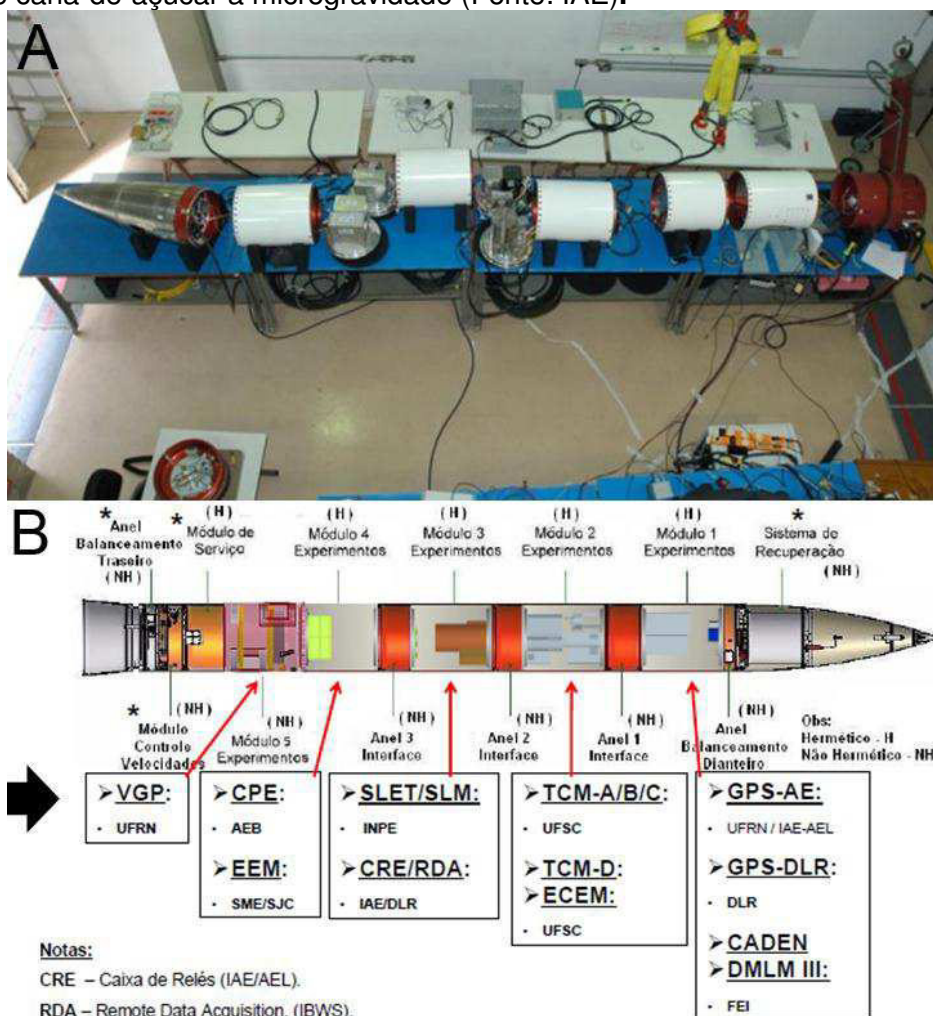


Com base na necessidade de respostas acerca dos efeitos da microgravidade real em plantas de cana-de-açúcar, foram desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, juntamente com a Agência Espacial Brasileira (AEB), experimentos de modo a submeter plantas de cana-de-açúcar em condições de microgravidade utilizando o sistema de um foguete de sondagem VSB-30. Esse foguete é um veículo de 12 metros de comprimento, que pesa aproximadamente duas toneladas e foi criado para permitir a execução de experimentos em microgravidade nas diversas áreas do conhecimento.

O VSB-30 começou a ser desenvolvido em 2001, pelas equipes do Instituto de Aeronáutica e Espaço (IAE) do Departamento de Tecnologia Aeroespacial (DCTA), em cooperação com a Agência Espacial Alemã (DLR), com o objetivo de substituir os antigos foguetes ingleses Skylark 12 no programa de microgravidade europeu. Esse foguete é uma versão do VS-30 acrescido de um estágio para aumentar a capacidade de carga-útil e tempo de microgravidade. O foguete é estabilizado por empenas e lançado a partir de trilhos. A carga útil é composta por módulo de serviço, módulo de recuperação, módulos de experimentos e anéis interface, fabricados em alumínio. Estes módulos são interligados mecanicamente por parafusos e contêm conectores elétricos compondo a rede elétrica¹ (Figura 4A).

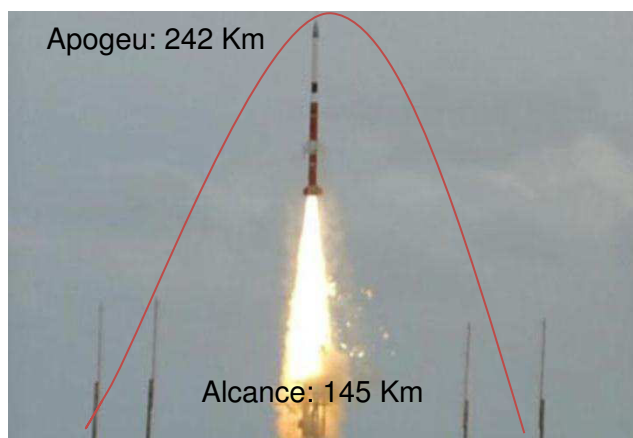
¹ Maiores informações técnicas sobre o veículo VSB-30 podem ser encontradas no sítio eletrônico da Agência Espacial Brasileira (AEB), em: <http://www.aeb.gov.br/programa-espacial/veiculos-lancadores>.

Figura 4: Foguete de sondagem VSB-30. (A) Montagem da carga útil do foguete de sondagem utilizado no lançamento do experimento contendo as plantas de cana-de-açúcar ao espaço, no Centro de Lançamento de Alcântara (MA) (B) Esquema mostrando os diferentes compartimentos da carga útil do foguete destinados à realização de experimentos embarcados no voo espacial, com destaque para o módulo do ensaio VGP de submissão de plantas de cana-de-açúcar à microgravidade (Fonte: IAE).



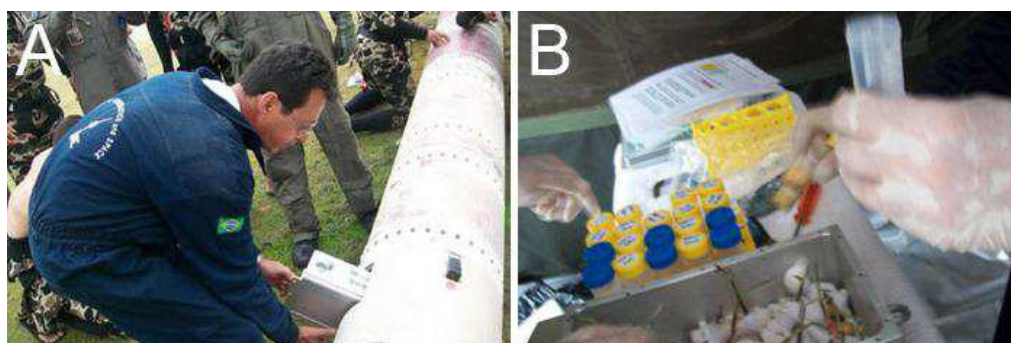
As caixas com as plantas foram introduzidas no foguete de sondagem VSB-30, no módulo da carga útil, em um espaço destinado ao experimento com plantas (VGP) (Figura 4B). O lançamento ocorreu no dia 12 de dezembro de 2010, no Centro de Lançamento de Alcântara (CLA), em Alcântara, Maranhão (02°22'39.52"S e 44°23'57.71"W), às 13:35 horas (Figura 5). O foguete atingiu um apogeu de 242 km, alcance de 145 km e o tempo total do voo foi de aproximadamente 18 minutos, sendo seis de microgravidade.

Figura 5: Lançamento do VSB-30. Foguete VSB-30 lançado no dia 12 de dezembro de 2010, no Centro de Lançamento de Alcântara (CLA) (Fonte: IAE).



A submissão das plantas de cana-de-açúcar a um período de seis minutos de microgravidade foi um dos experimentos realizados durante a missão intitulada Operação Maracati II, realizada pelo Instituto de Aeronáutica e Espaço (IAE/DCTA). Após os 18 minutos de voo, a carga útil retornou e caiu no mar, amparada por paraquedas, e esta foi recuperada por uma equipe da Força Aérea Brasileira (FAB) a bordo de um helicóptero H-60L *Black Hawk* e conduzida a uma base na Ilha de Santana onde as duas caixas contendo as plantas de cana-de-açúcar foram retiradas da carga útil (Figura 6A). Na base avançada montada para a missão, as caixas contendo as plantas foram abertas e o material vegetal foi isolado e colocado na solução RNA/ater (Ambion) para as amostras de RNA, no gelo para os ensaios enzimáticos ou na solução de FAA (Formaldeído, álcool e ácido acético) para as análises de anatomia (Figura 6B).

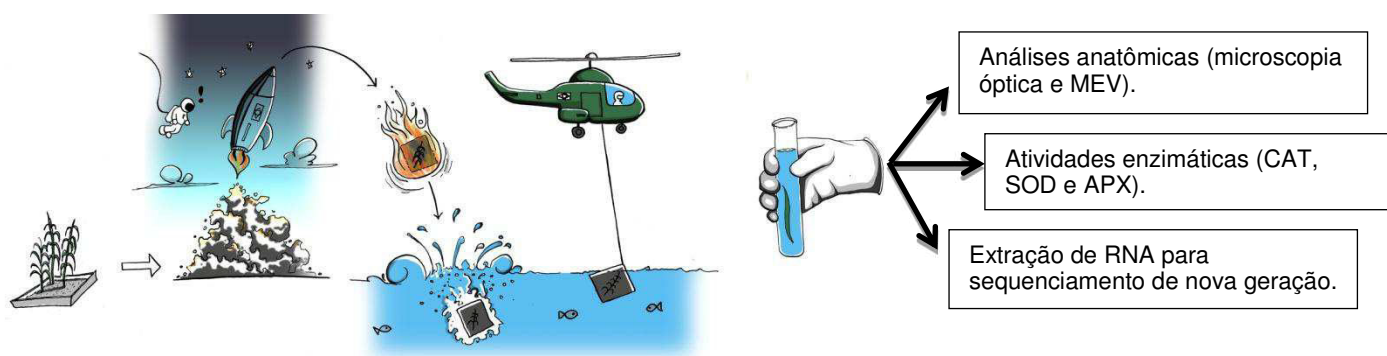
Figura 6: Recuperação da carga útil. (A) Técnico do IAE retirando uma das caixas contendo as plantas do ensaio de microgravidade após o resgate da carga útil. (B) Amostras sendo acondicionadas em soluções específicas para as análises posteriores (Fonte: IAE).



As amostras foram transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, onde foram

armazenadas em freezer -80°C para as análises subsequentes (Figura 7). Uma das plantas exposta ao voo espacial também foi trazida para a UFRN onde foi replantada (sob condições naturais) e teve seu crescimento observado. Amostras de folhas e raízes dessas plantas foram selecionadas para as diferentes análises anatômicas.

Figura 7: Ensaio de microgravidade. Etapas do ensaio de microgravidade, desde o crescimento das plantas, passando pelo lançamento no foguete, seguido da recuperação da carga útil e destinação de amostras de folhas e raízes para análises de anatomia, atividades enzimáticas e sequenciamento de RNA.



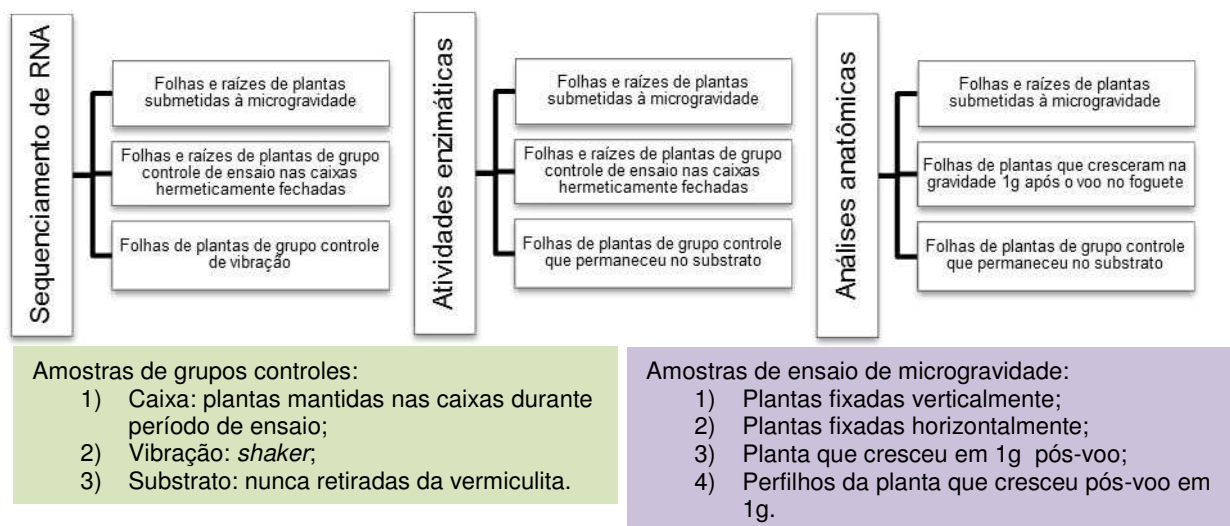
3.2.2 – Controles de ensaio

Para garantir que as possíveis mudanças morfofisiológicas e de expressão detectadas sejam oriundas da exposição ao voo espacial e à microgravidade, foram realizados controles de ensaio, de modo a eliminar prováveis interferências nos resultados. Os principais eventos que poderiam afetar o experimento de microgravidade são a vibração a qual o foguete foi submetido, bem como o próprio fato de as plantas serem retiradas do substrato e conduzidas às caixas de alumínio, privadas de iluminação, pelo período correspondente às fases de preparação, lançamento e recuperação da carga útil do foguete (cerca de seis horas).

Logo, foram selecionados grupos de plantas com 10 dias de desenvolvimento para a realização de controles de ensaio simulando a vibração do veículo VSB-30. Para o ensaio de estresse por vibração, as plantas foram dispostas na caixa de alumínio e, em seguida, colocadas em um *shaker* que vibra em três eixos, simulando a vibração produzida no foguete em seu lançamento e na reentrada na Terra após o voo. Esse controle foi realizado em São José dos Campos, São Paulo, no INPE. Após os ensaios, estas amostras foram colocadas na solução de *RNAlater* (Ambion), congeladas e trazidas para a UFRN. Em virtude das

limitações de amostra desse ensaio de vibração, foi dada a preferência de utilização dessas amostras do controle de vibração apenas para os experimentos de sequenciamento (Figura 8).

Figura 8: Amostras de tecidos para os diferentes ensaios. Representação esquemática das amostras utilizadas para as diferentes etapas de sequenciamento de RNA, análises das atividades enzimáticas e da anatomia das plantas, de forma a verificar os efeitos da microgravidade.



Outro ensaio realizado, para reduzir a eliminação de possíveis interferências no experimento do voo espacial, foi o controle de manipulação das amostras nas caixas. Assim, as plantas de cana-de-açúcar com 10 dias de desenvolvimento foram dispostas em caixas de alumínio, envoltas no tecido de algodão embebido em água e fixadas no suporte – de maneira equivalente ao dia do lançamento no foguete (figura 3C). As plantas foram colocadas nas duas orientações do ensaio de microgravidade: horizontal e verticalmente, e permaneceram nas caixas por um período de 6 horas, analogamente ao tempo em que as amostras ficaram durante o experimento no veículo de sondagem VSB-30.

3.3 – EXTRAÇÃO DE RNA

Após a obtenção de material vegetal submetido ao voo espacial e às condições de controles de ensaio acima expostas (controle da vibração do foguete e da manipulação e disposição nas caixas de alumínio), deu-se seguimento à extração do RNA, de modo a verificar respostas moleculares da planta expressas em razão da alteração da gravidade. Para isso, foram coletadas amostras de folhas e raízes

das plantas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse de microgravidade, bem como às condições controles.

As amostras supracitadas foram pulverizadas em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo. Posteriormente, foi realizada a extração de RNA utilizando o kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN) conforme as recomendações do fabricante. A eficiência e qualidade da extração foram observadas primeiramente em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídeo (Sigma), segundo o protocolo descrito em Maniatis *et al.*, 2001.

Após a verificação do padrão da corrida eletroforética em gel de agarose, a amostra foi tratada com DNase (Ambion) conforme recomendado pelo fabricante. Foram aliqüotados 10 µg da amostra de RNA total e adicionados 3 µL de *buffer* 10x, 1 µL de RNaseout Inhibitor (Invitrogen), 2 µL de DNase e 11 µL de água ultrapura (MilliQ) contendo DEPC a 0,1%, totalizando um volume final de 29 µL. Essas amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos e, após esse tempo, adicionou-se mais 1 µL de DNase. Após esta adição, as amostras foram incubadas a 37°C por mais 30 minutos. Por fim, adicionou-se 6 µL de resina (Ambion) para a parada da reação e as amostras ficaram incubadas por 2 minutos à temperatura ambiente (23-24°C). Os tubos foram centrifugados por 2 minutos, a 800 x *g* e a fase superior foi transferida para novo tubo.

A integridade do RNA total extraído após o tratamento com DNase foi analisada novamente, desta vez utilizando a plataforma do Agilent 2100 Bioanalyzer, a qual avalia inequivocamente a qualidade em termos de degradação através da geração de um eletroferograma e cálculo do RIN (*RNA integrity number*).

3.4 – SEQUENCIAMENTO DE RNA

As amostras de RNA total foram enviadas para a empresa FASTERIS SA, na Suíça, para o sequenciamento do RNAm. Foi utilizada a plataforma Solexa/Illumina, que é uma das principais plataformas do sequenciamento de nova geração. As amostras são processadas *in vitro* para gerar uma biblioteca de insertos curtos. Depois de um controle de qualidade do RNA, construção da biblioteca, esta biblioteca é sequenciada no HiSeq Illumina 2000. As sequências geradas sofreram um pré-tratamento para retirar possíveis contaminações de sequências

correspondentes aos adaptadores. Foi utilizado o IlluQC para avaliação de controle de qualidade das sequencias.

3.5 – ANÁLISES ANATÔMICAS

3.5.1 – Processamento do material vegetal

Com o intuito de analisar possíveis alterações estruturais nas plantas submetidas ao voo espacial, foram realizadas análises anatômicas. Para essas análises, foram utilizadas folhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar submetidas ao voo espacial tanto na orientação vertical como na horizontal, bem como amostras de folhas e raízes de plantas de um grupo controle que cresceu na gravidade 1g, com a mesma idade daquelas do ensaio de microgravidade, sem nunca terem sofrido qualquer alteração gravitacional. Também foram analisadas amostras de plantas que foram expostas à microgravidade e cresceram em gravidade 1g após o voo.

Para isso, foram selecionadas amostras de tecidos vegetais (folhas e raízes) para fixação em FAA (formaldeído, álcool e ácido acético 1:18:1, respectivamente) por 48 horas. Em seguida, o material fixado foi acondicionado em recipientes contendo álcool 70%. Para a preparação dos cortes histológicos, foi utilizada a técnica do emblocamento em parafina. Inicialmente foram feitas desidratações, colocando os tecidos em contato com álcool etílico em concentrações que aumentam gradativamente em períodos sucessivos de 1 hora, de modo a retirar a água sem ocasionar danos à célula: primeiramente foi utilizado álcool 70%, seguido de álcool 80%, 90% e 100%, totalizando quatro horas de desidratação. As etapas subsequentes consistiram em deixar os tecidos vegetais em contato durante uma hora com uma mistura de álcool 100% e xilol PA 1:1, seguido de xilol PA (por mais uma hora) e xilol PA com parafina (1:1) (também por uma hora). Em seguida, foram realizadas três trocas sucessivas de parafina líquida em intervalos de uma hora (Tabela 1).

Por fim, foi feita a inclusão do material, com auxílio de uma pinça, em blocos de parafina que foram montados utilizando barras de metal como molde. Após duas horas no congelador, os blocos ficaram prontos para o corte com micrótomo rotativo (Leica, modelo RM2125RT) em seções de cinco µm. Após o corte, o material foi

aderido à lâmina através da pescagem em banho maria e a lâmina foi identificada e levada à estufa (60 °C) por vinte minutos. A Tabela 1 apresenta, de forma sucinta, todas as etapas dessa fase de processamento do material vegetal para emblocamento.

Tabela 1 - Etapas de emblocamento de folhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar (SP81 3250) com 10 dias de desenvolvimento, submetidas ao voo espacial e em condições controle (crescidas em gravidade 1g).

Etapas de emblocamento	Duração
FAA	48 horas
Álcool 70%	1 hora
Álcool 80%	1 hora
Álcool 90%	1 hora
Álcool 100%	1 hora
Álcool 100% + Xilol PA (1:1)	1 hora
Xilol PA	1 hora
Xilol PA + Parafina	1 hora
Parafina	1 hora
Parafina	1 hora
Parafina	1 hora
Parafina (emblocamento)	-

3.5.2 – Montagem das lâminas e coloração

Para a realização das análises em microscopia óptica, foi necessária a coloração e montagem das lâminas. Uma vez que o material a ser analisado estava emblocado, foi preciso desparafinizar – colocando o conjunto de lâminas em um suporte adequado e imergindo em recipientes contendo xilol por 5 minutos – e, em seguida, hidratar em concentrações alcoólicas decrescentes. A sequência de preparação foi: Xilol I (5 minutos), Xilol II (5 minutos), Álcool 100% (5 minutos), Álcool 90% (5 minutos), Álcool 70% (5 minutos) e Água destilada (5 minutos). Em seguida, as lâminas foram colocadas na estufa (60 °C) por 2 horas para secagem. Após a secagem, as lâminas foram coradas e montadas.

Os cortes foram analisados através da utilização de corantes que permitiram a detecção subcelular de componentes específicos, de modo a compreender as possíveis alterações estruturais decorrente do voo no foguete VSB-30 (Tabela 2). Foram utilizados, para coloração das lâminas, os seguintes corantes: azul de toluidina, safranina, cloreto de zinco iodado e diaminobenzidina – DAB. As lâminas coradas com cloreto de zinco e DAB foram do tipo temporárias, enquanto que as

demais foram do tipo semipermanentes, para as quais foi utilizada a resina Entellan para selagem. Foram realizadas triplicatas das amostras e o processo de montagem das lâminas histológicas do material vegetal para análise em microscopia óptica foi realizado no Laboratório de Histologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Tabela 2 – Relação dos corantes utilizadas nas análises de anatomia com microscopia óptica e as substâncias evidenciadas por eles.

Corante	Indicador
DAB	Peróxido de hidrogênio
Cloreto de zinco iodado	Amido (preto) e lignina (amarelo)
Azul de toluidina	Lignina
Safranina	Lignina

As lâminas histológicas montadas conforme descrito acima foram examinadas ao microscópio óptico (Olympus BX41) em campo claro, com aumentos de 10x (raízes) e 40x (folhas). As imagens foram obtidas com auxílio de câmera Nikon DXM 1200 acoplada ao microscópio e o software Nikon ACTL, equipamentos localizados no Laboratório de Neuroanatomia, no Centro de Biociências, UFRN.

3.5.3 – Análise em microscopia eletrônica de varredura

Foram utilizadas amostras de folhas e raízes de plantas submetidas ao voo do foguete de sondagem, nas orientações vertical e horizontal, bem como amostras da planta que foi submetida à microgravidade e, ao retornar, foi replantada e crescida em condições de gravidade terrestre (1 *g*). Essa planta produziu perfilhos, os quais também foram analisados para averiguar a existência de possíveis alterações oriundas da exposição ao voo no foguete de sondagem. Como controles, foram utilizadas amostras de plantas que cresceram em gravidade terrestre (1*g*), sem qualquer interferência de microgravidade. Para todas as amostras, as análises foram realizadas em triplicatas.

Para as análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram utilizadas amostras de raízes e folhas fixadas segundo o protocolo descrito para preparação em microscopia óptica. A preparação e análises das amostras foram realizadas no Núcleo de Estudos em Petróleo e Gás Natural, na UFRN. Inicialmente, amostras de folhas e raízes foram montadas sobre fita adesiva condutora de

carbono fixada em *stubs* (suportes de alumínio) e cola prata (Agar), para garantir o contato elétrico (Figura 9). Em seguida, as amostras foram desumidificadas e metalizadas (pulverizadas na câmara de vácuo com uma camada ouro, de material eletricamente condutivo) de modo a torná-las condutoras e garantir imagens com boa resolução no MEV.

Figura 9: Preparação de amostras para o MEV. Folhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar do ensaio de microgravidade e grupo controle fixados aos *stubs* para análise no microscópio eletrônico de varredura (Fonte: Acervo pessoal).



3.6 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Para a realização das análises de atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), foram utilizadas amostras de folhas e raízes de plantas submetidas ao voo no foguete de sondagem VSB 30, fixadas às caixas de alumínio nas orientações vertical e horizontal; folhas e raízes de plantas do grupo de controle de ensaio (que passaram 6 horas nas mesmas condições daquelas do ensaio de microgravidade, mas sem o voo no foguete); e folhas e raízes de plantas que cresceram na gravidade terrestre, no substrato, sem qualquer tipo de manipulação. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicatas.

3.6.1 – Extração de proteínas solúveis

Para a extração de proteínas solúveis foram utilizados o tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 contendo EDTA 1 mM e ácido ascórbico 0,5 mM. Utilizou-se 250 mg de amostras de folhas e raízes previamente armazenadas em freezer -80°C as quais, em seguida, foram maceradas com nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. A amostra macerada foi homogeneizada com 1,2 mL do tampão

fosfato de potássio e transferida para tubos de 2,0 mL que permaneceram em banho de gelo até a centrifugação a 13.000 x *g*, 4°C por 20 minutos. Em seguida, foi coletado o sobrenadante e descartado o precipitado. As amostras de proteínas foram quantificadas segundo o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.6.2 – Ensaio para determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD)

O protocolo de determinação da atividade de SOD foi baseado na metodologia de Peixoto *et al.*(1999). Utilizou-se, para esse ensaio, o tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 contendo EDTA 0,1 mM e L-Metionina 13 mM. Foram utilizado também NBT 750 µM e riboflavina 1 mM. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, com capacidade para 400 µL e a ordem de adição de reagentes foi a seguinte: primeiramente foi adicionado o tampão fosfato de potássio 50 mM, seguido de NBT, amostra (extrato bruto) e riboflavina, sendo esta última adicionada em ambiente com o mínimo de luminosidade. Para o ensaio de atividade de SOD, foram feitos brancos de amostra e de reação. A microplaca foi exposta à luz por 2 minutos e lida em um espectrofotômetro para microvolumes Epoch, da Biotek, no comprimento de onda de 560 nm. Uma unidade de enzima correspondeu à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do Nitro-blue tetrazolium (NBT). Os resultados foram expressos em unidade de enzima por miligrama de proteína.

3.6.3 – Ensaio para determinação da atividade de catalase (CAT)

Foi utilizado como referência metodológica nesse ensaio o trabalho de Havir & McHale (1987). Para o ensaio de CAT, utilizou-se o tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 a 30°C contendo peróxido de hidrogênio 20 mM. As leituras foram realizadas em cubetas de quartzo, no comprimento de onda de 240 nm utilizando espectrofotômetro. Antes da leitura das amostras, foi zerado o equipamento com tampão de atividade de CAT sem adição de peróxido de hidrogênio. Em seguida, foi feita a leitura do branco com tampão de atividade de CAT contendo peróxido de hidrogênio e tampão de extração das enzimas. Por fim, 50 µL de cada amostras (extrato bruto) em tampão do ensaio contendo peróxido de hidrogênio, foram analisados no espectrofotômetro a 240 nm, durante cinco minutos, em intervalos de 30 segundos. Para o cálculo da atividade foi utilizado o coeficiente de extinção molar

calculado do peróxido de hidrogênio de $40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e os resultados foram expressos em μmol de H_2O_2 por grama de proteína por minuto.

3.6.4 – Ensaio para determinação da atividade de ascorbato peroxidase (APX)

O protocolo de ensaio de APX foi baseado na metodologia proposta por Nakano & Asada (1981). Inicialmente, preparou-se o tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo ácido L-ascórbico 0,5 mM e uma solução de peróxido de hidrogênio 30 mM. As leituras foram realizadas a 290 nm utilizando o espectrofotômetro GE.

Inicialmente, adicionou-se 100 μL de tampão de extração das enzimas, 2,7 mL de tampão de ensaio de APX com ascorbato 0,5 mM e 200 μL de peróxido de hidrogênio 30 mM para fazer um branco do reagente. Em seguida, em um novo tubo de ensaio adicionou-se 100 μL de amostra (extrato bruto) e 2,9 mL de tampão de ensaio de APX sem ascorbato, tendo-se, pois, um branco da amostra. Por fim, realizou-se a leitura da atividade enzimática, adicionando 100 μL de amostra (extrato bruto), 2,7 mL de tampão de ensaio de APX com ascorbato e 200 μL de peróxido de hidrogênio 30 mM. Para o cálculo da atividade foi utilizado o coeficiente de extinção molar do ascorbato de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados foram expressos em ηmol de ascorbato por grama de proteína por minuto.

3.6.5 – Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando análise de variância (ANOVA) e as diferenças foram localizadas pelo Teste de Tukey, com $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 – CANA-DE-AÇÚCAR: DA TERRA AO ESPAÇO

O protocolo de cultivo das plantas de cana-de-açúcar, estabelecido para a realização dos experimentos que contemplam essa pesquisa, permitiram a obtenção de um número satisfatório de plantas saudáveis, sem sinais de deficiência hídrica ou qualquer outro fator de estresse. Assim, foi possível selecionar grupos de plantas com 10 dias de desenvolvimento para os experimentos de microgravidade e os controles. No intuito de eliminar possíveis interferências de manipulação e acomodação das plantas nas caixas ao longo do experimento do voo espacial, foram realizados os controles do ensaio.

O ensaio de microgravidade, ocorrido no dia 12 de dezembro de 2010, no Centro de Lançamento de Alcântara (CLA), viabilizou a permanência das plantas sob a condição de microgravidade por seis minutos, sendo um total de 18 minutos de voo no foguete de sondagem. É indispensável salientar que as plantas passaram cerca de 6 horas dentro das caixas de alumínio, nas quais a média de temperatura foi em torno de 37°C, mesmo durante o lançamento e a reentrada do foguete na atmosfera terrestre.

Uma das etapas mais importante foi o resgate do módulo da carga útil do foguete após o voo e, por consequência, do material vegetal, também foi realizado com êxito, o que permitiu a extração subsequente de RNA de raízes e folhas das plantas como também a obtenção dos tecidos para as análises anatômicas e enzimáticas.

4.2 – EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE RNA

Com o intuito de identificar genes diferencialmente expressos após a submissão a microgravidade foi realizada a extração de RNA total e posterior sequenciamento. A primeira etapa deste experimento foi a comprovação da qualidade da extração de RNA total de amostras de folhas e raízes de plantas submetidas ao voo no foguete de sondagem, bem como de plantas pertencentes a grupos controle de ensaio de estresse por vibração e manipulação do material vegetal para o experimento (controles com gravidade). Esta deu-se através de corrida eletroforética em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, no qual se pode observar a presença de duas bandas bem definidas, que correspondem às

unidades de RNA ribossomais 18S e 28S (Figura 10), o que atesta a qualidade da extração para todas as amostras analisadas.

Após o tratamento com DNase - de modo a eliminar qualquer contaminação da amostra por DNA – verificou-se, através da plataforma do Agilent 2100 Bioanalyzer, que havia concentração de RNA suficiente e qualidade necessária para a etapa de sequenciamento na plataforma Solexa/Illumina. Essa ferramenta fornece um controle de qualidade da integridade do RNA revelado por um valor chamado RIN (*RNA Integrity Number*). Todas as amostras apresentaram RIN acima de 9, o que é considerado ideal para atestar uma boa integridade do RNA total. O eletroferograma gerado pelo Bioanalyzer para as amostras de RNA das plantas exibiu dois picos distintos (das unidades de RNA ribossomais 18S e 28S), sem fragmentos de degradação entre essas duas bandas ou antes do pico do 18S (Figura 11).

Figura 10: Controle de qualidade da extração de RNA. Resultado da extração de RNA de folhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar submetidas ao voo espacial no veículo VSB-30 fixadas em suporte específico nas orientações vertical e horizontal. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

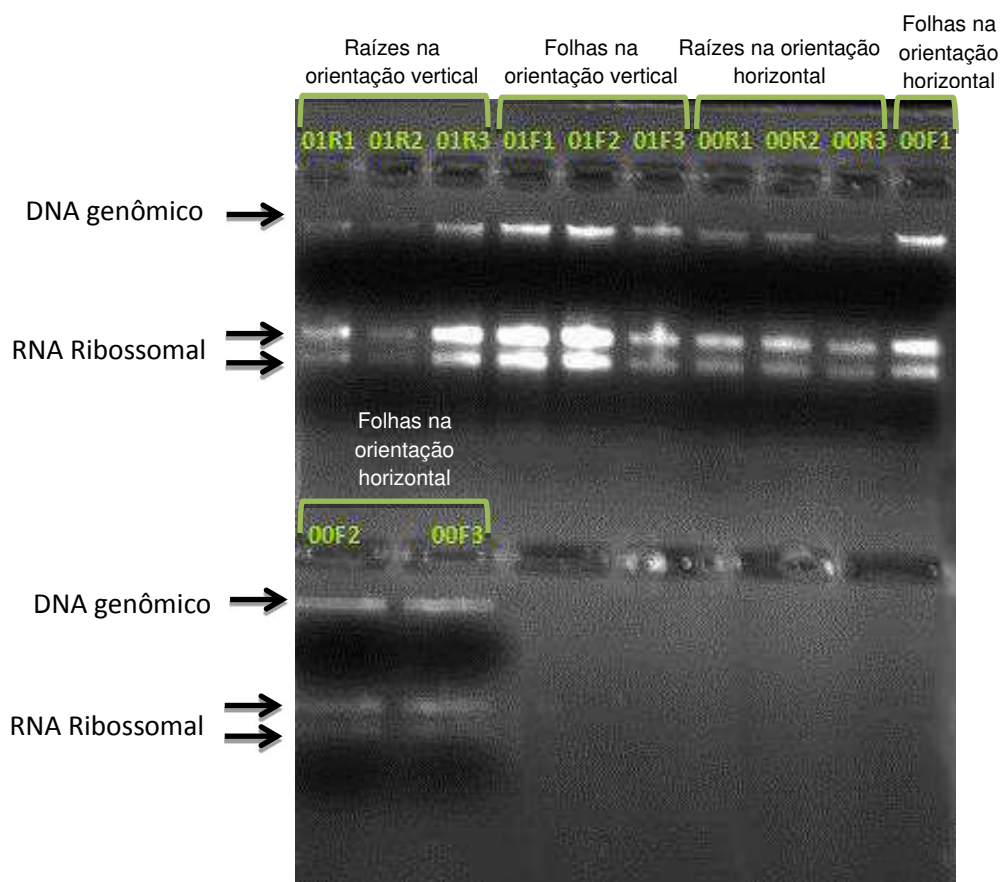
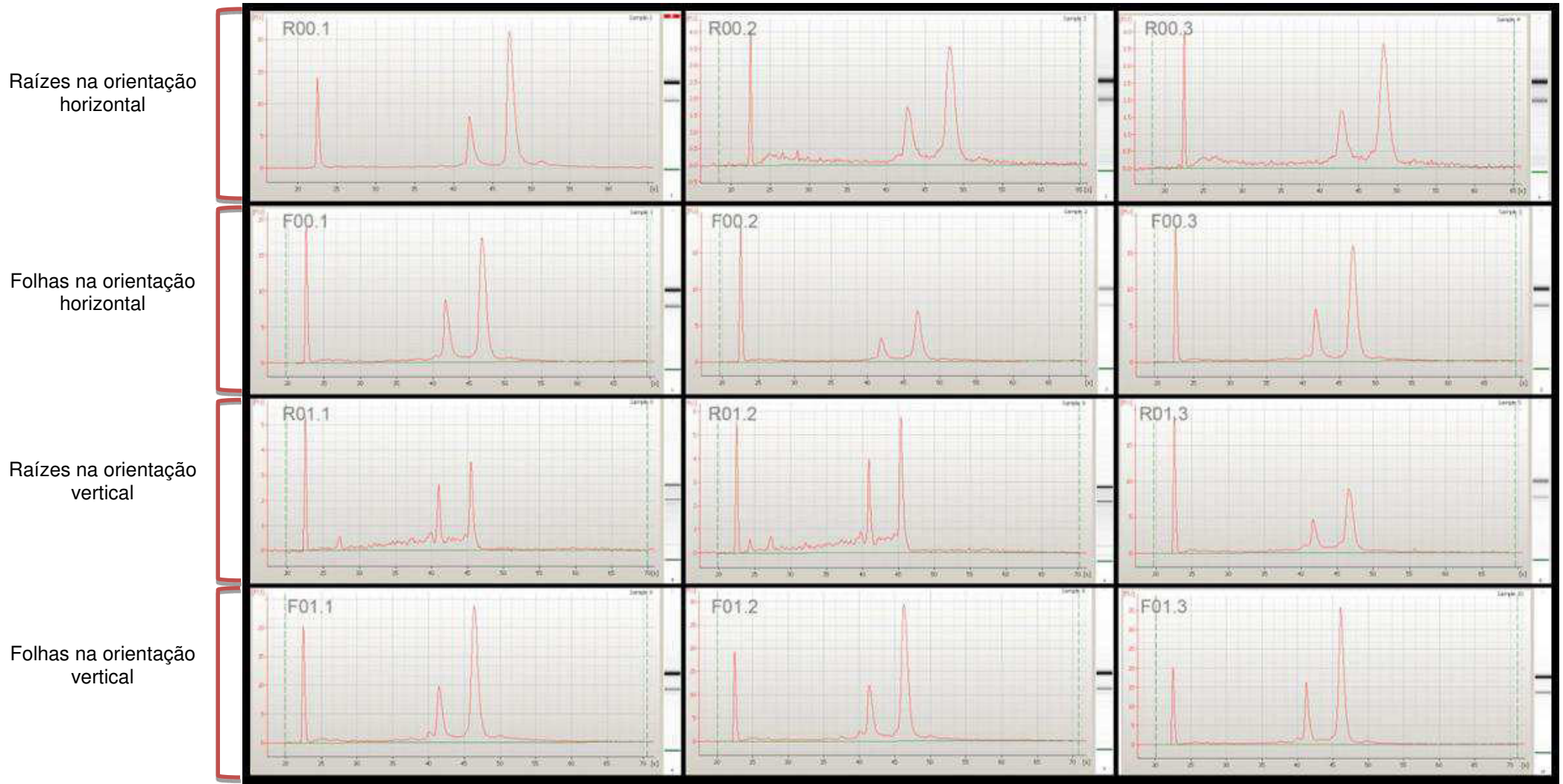


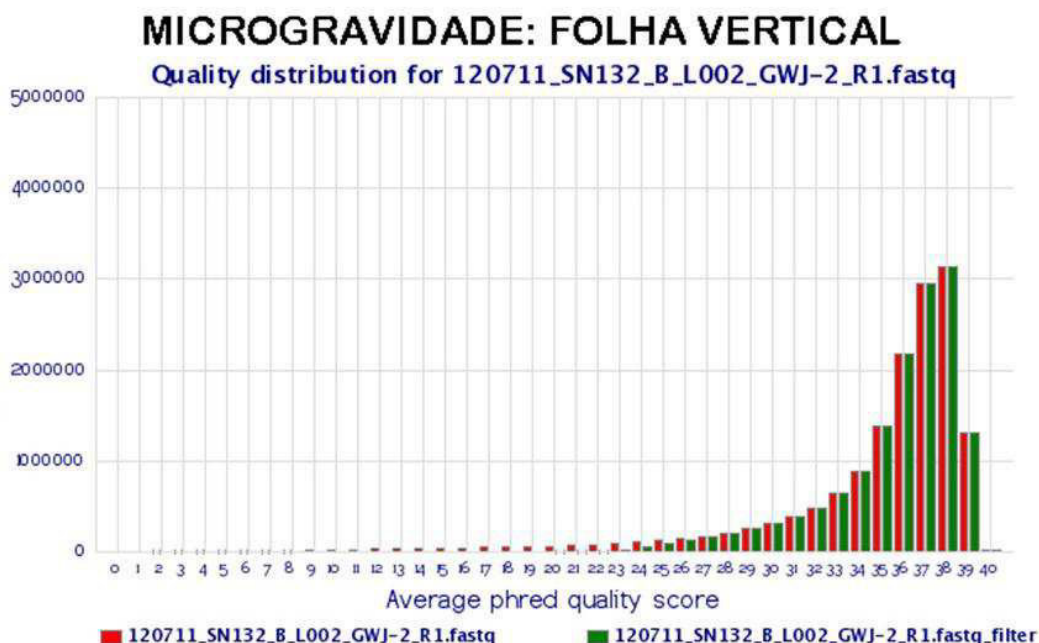
Figura 11: Controle de qualidade da extração de RNA. Eletroferogramas gerados pelo Agilent 2100 Bioanalyzer de amostras de RNA de folhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar submetidas ao voo espacial no veículo VSB-30 fixadas em suporte específico nas orientações vertical e horizontal. O eixo y apresenta unidades de fluorescência (FU) e o eixo x, o tempo em segundos (s).



O processo de sequenciamento também foi realizado com sucesso, uma vez que as amostras enviadas para a empresa FASTERIS SA (Suíça) chegaram ao destino mantendo sua integridade e puderam ser sequenciadas na plataforma Solexa/Illumina durante o tempo previsto. A inovação da plataforma Solexa consiste na clonagem *in vitro* dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, processo também conhecido como PCR de fase sólida (CARVALHO & SILVA, 2009). Os dados foram enviados pela FASTERIS em formato FASTQ, contendo os *reads* e os escores de qualidade correspondentes. A validação da qualidade das sequencias foi realizada utilizando o NGS QC Toolkit (v 2.2), no Laboratório de Glicobiologia Molecular, no Centro de Biociências, UFRN. A utilização das ferramentas do IlluQC é imprescindível, uma vez que o sequenciamento de nova geração fornece uma enorme quantidade de dados, os quais devem ter sua qualidade atestada para tornarem-se acessíveis às futuras análises.

Dessa forma, foi executado o script IlluQC.pl (ferramenta para controle de qualidade de dados gerados pela plataforma Illumina), utilizando phred > 20 (valor de qualidade associado à chance de um em cem de a base estar nomeada incorretamente). O IlluQC gerou gráficos que demonstraram a excelência na qualidade das sequencias de RNA de todas as amostras, tanto das plantas submetidas à microgravidade como daquelas dos grupos controles de vibração e de manipulação nas caixas. As Figuras 12 e 13 apresentam os dados relativos ao escore phred (Ewing *et al.*, 1998) das sequencias de entrada (em vermelho) e das sequencias filtradas pelo IlluQC (em verde), na figura 12 é dado destaque aos resultados da expressão de um dos tratamentos para melhor visualização. Observa-se que as sequencias filtradas de alta qualidade apresentam, em média, escore phred acima de 23.

Figura 12: Controle de qualidade do NGS. Distribuição de valores de qualidade atribuídos às bases (phred score) de sequencias de RNA de folhas de plantas de cana-de-açúcar submetidas à microgravidade na orientação vertical.



O IlluQC também gera gráficos circulares que apresentam os *reads* de alta qualidade com os dados já filtrados, onde os *reads* de baixa qualidade e contaminações de adaptadores foram retirados (Figura 14). Esses gráficos relativos às sequencias das nove bibliotecas enviadas (incluindo tecidos de folhas e raízes de plantas submetidas à microgravidade e os respectivos controles) apresentaram predominância de *reads* de boa qualidade.

Figura 13: Controle de qualidade do NGS. Distribuição de valores de qualidade atribuídos às bases (escore phred) de sequencias de RNA de folhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar submetidas à microgravidade nas orientações vertical e horizontal, folhas de plantas que passaram por um controle de vibração do foguete e folhas e raízes de plantas de grupos controles de ensaio na caixa hermeticamente fechada, sem sofrer qualquer alteração na gravidade.

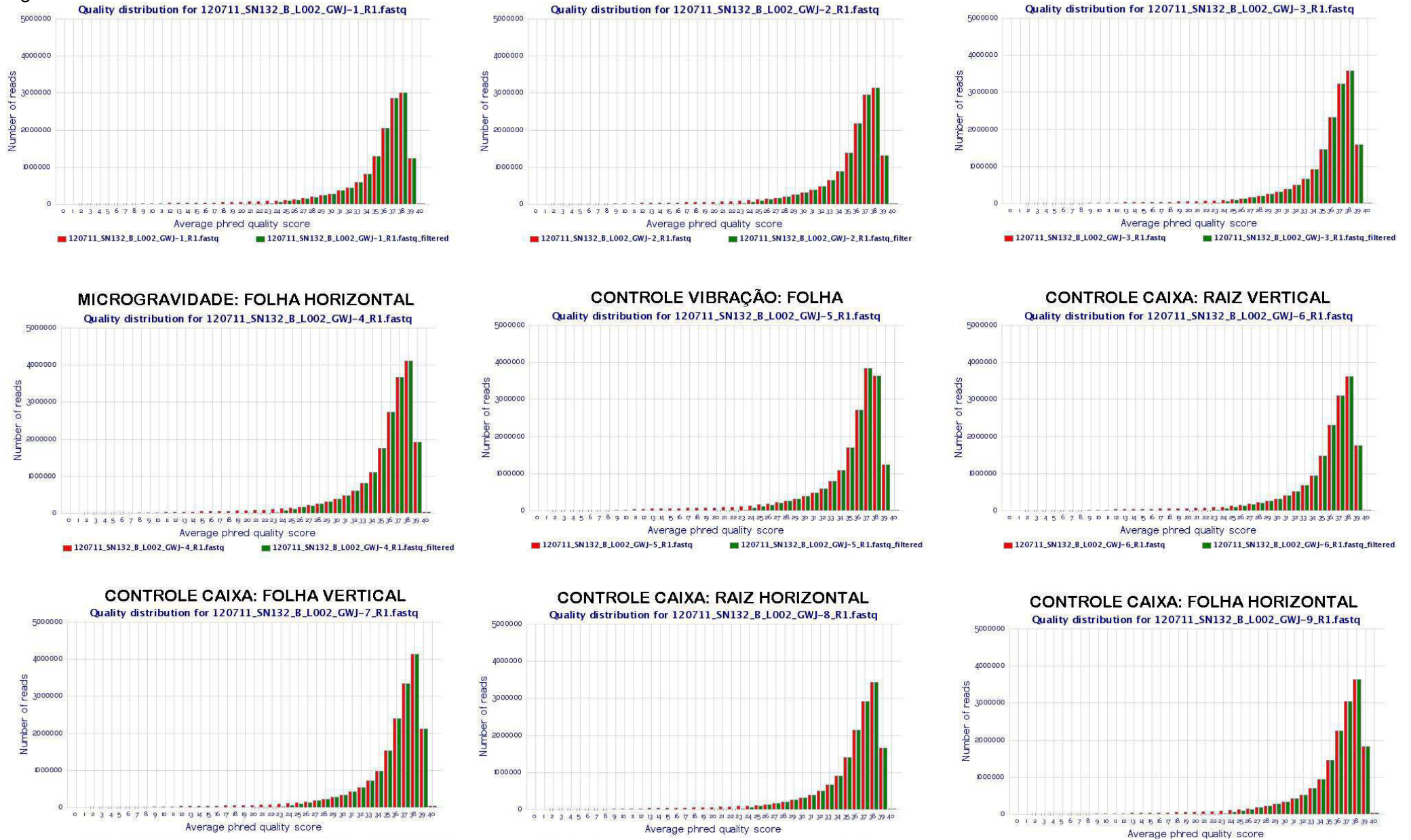
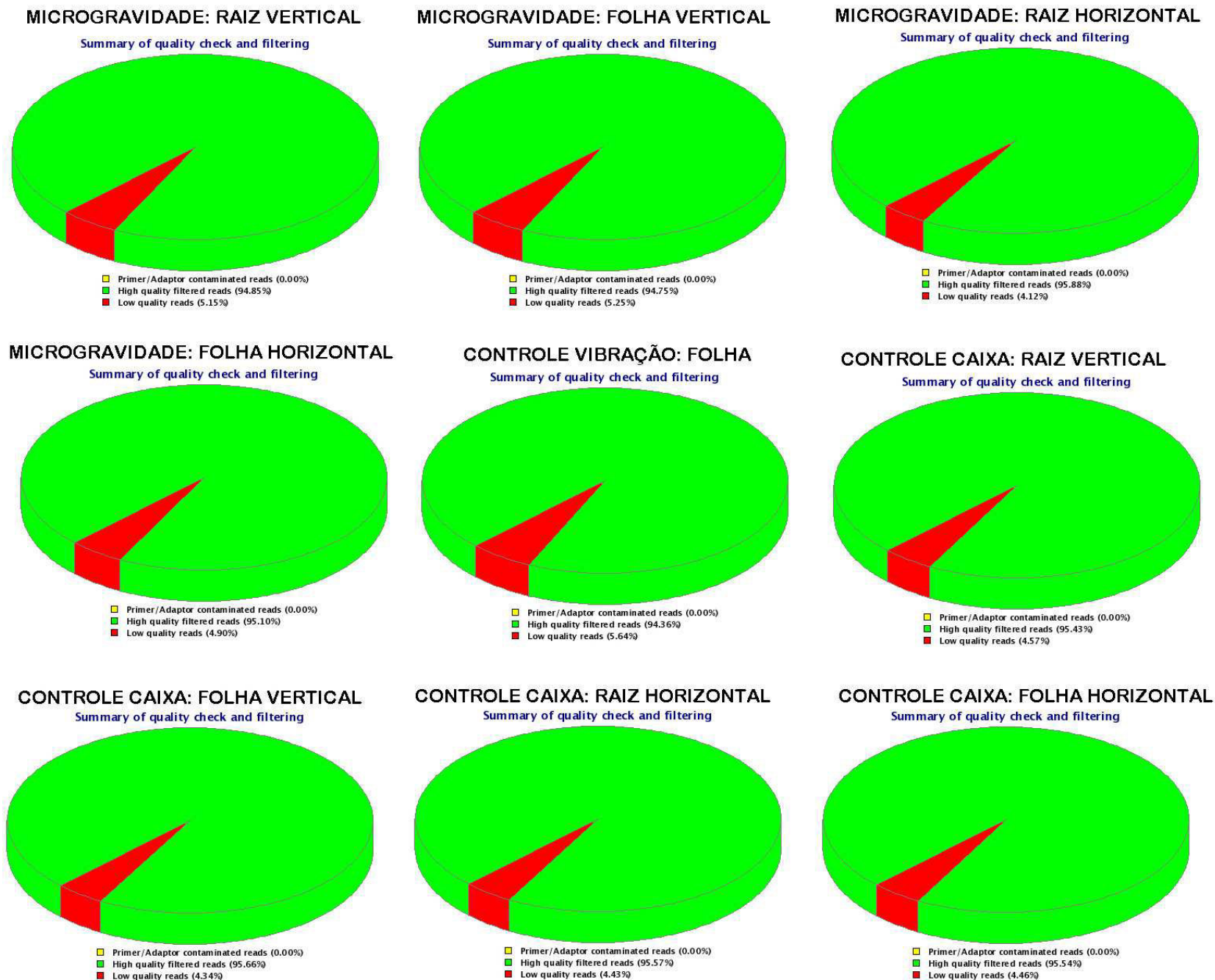


Figura 14: Controle de qualidade do NGS. Gráficos circulares que apresentam as porcentagens de reads de alta qualidade com os dados já filtrados (verde), de baixa qualidade (vermelho) e contaminações de adaptadores (em amarelo, mas que não foi observada para os nossos dados da plataforma Illumina) de sequencias de RNA de folhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar submetidas à microgravidade nas orientações vertical e horizontal, folhas de plantas que passaram por um controle de vibração do foguete e folhas e raízes de plantas de grupos controles de ensaio na caixa hermeticamente fechada, sem sofrer qualquer alteração na gravidade.



As etapas de extração de RNA e sequenciamento subsequente foram realizadas com êxito, haja vista a validação através de eletroferogramas da corrida no Bioanalyzer e execução de comandos utilizando o IlluQC para filtrar sequências de alta qualidade, as quais foram predominantes nos dados fornecidos pela FASTERIS SA. As ferramentas do pacote do NGS QC Toolkit possibilitaram uma eficiente checagem de qualidade e filtração de dados de sequenciamento de nova geração (PATEL & JAIN, 2012).

4.3 – ANÁLISES ANATÔMICAS

4.3.1 – Análises por microscopia óptica

O conhecimento da anatomia vegetal tem relevante papel nesta pesquisa, pois o fornecimento de dados sobre a organização estrutural vegetal que possibilita a compreensão, com maior profundidade, do comportamento das plantas de cana-de-açúcar submetidas à condição de microgravidade. Foram realizadas análises da anatomia vegetal através da elaboração de lâminas com cortes histológicos de folhas e raízes de plantas submetidas ao voo no foguete de sondagem, bem como de plantas da mesma idade, mas que não foram submetidas ao lançamento no foguete (amostras controle), vislumbrando a observação de possíveis alterações nas características estruturais das plantas de cana-de-açúcar em decorrência do voo e da microgravidade.

De modo a tornar compreensível o motivo pelo qual a planta que cresceu na gravidade normal (1 *g*) - após o voo no foguete – apresentou retardo em seu crescimento, também foram feitas análises anatômicas desse grupo de vegetais utilizando microscopia óptica. Para isso, foram coletadas amostras de folhas e raízes dessa planta após um ano crescendo em condições normais de gravidade após o voo no veículo VSB-30, bem como de seus perfilhos, com seis meses.

A Figura 15 mostra um esquema de seção transversal de folhas de cana-de-açúcar em condições normais, onde se observa a epiderme nas faces abaxial (inferior) e adaxial (superior), constituída por uma camada de células; células bulbiformes, maiores e arredondadas; região de anatomia Kranz; e área de feixes vasculares: xilema e floema. Já a Figura 16 apresenta um esquema evidenciando importantes características anatômicas em raiz de cana-de-açúcar, onde podem ser

observados área de aerênquima, polos de metaxilema, medula delimitada pelo cilindro vascular, endoderme e córtex.

Os corantes utilizados nesse trabalho possibilitaram uma melhor visualização e diferenciação das estruturas. O azul de toluidina (AT), um corante azul básico catiônico, foi reconhecido por O'Brien *et al.* (1964) como um importante corante para identificar lignina na parede celular de tecidos vegetais, os quais apresentam tonalidades de azul que variam conforme a composição de lignina na parede (regiões não lignificadas tendem a apresentar uma coloração azul-arroxeadada).

Figura 15: Folha de cana-de-açúcar em condições normais. Esquema apresentando características anatômicas de seção transversal de folha de cana-de-açúcar.

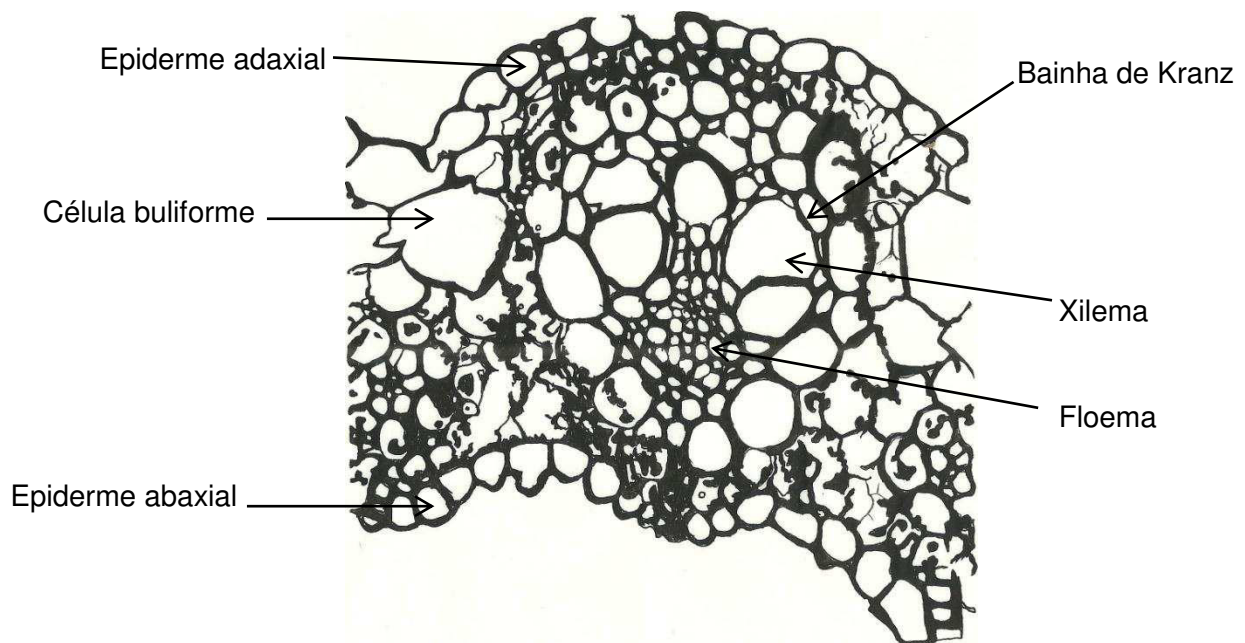
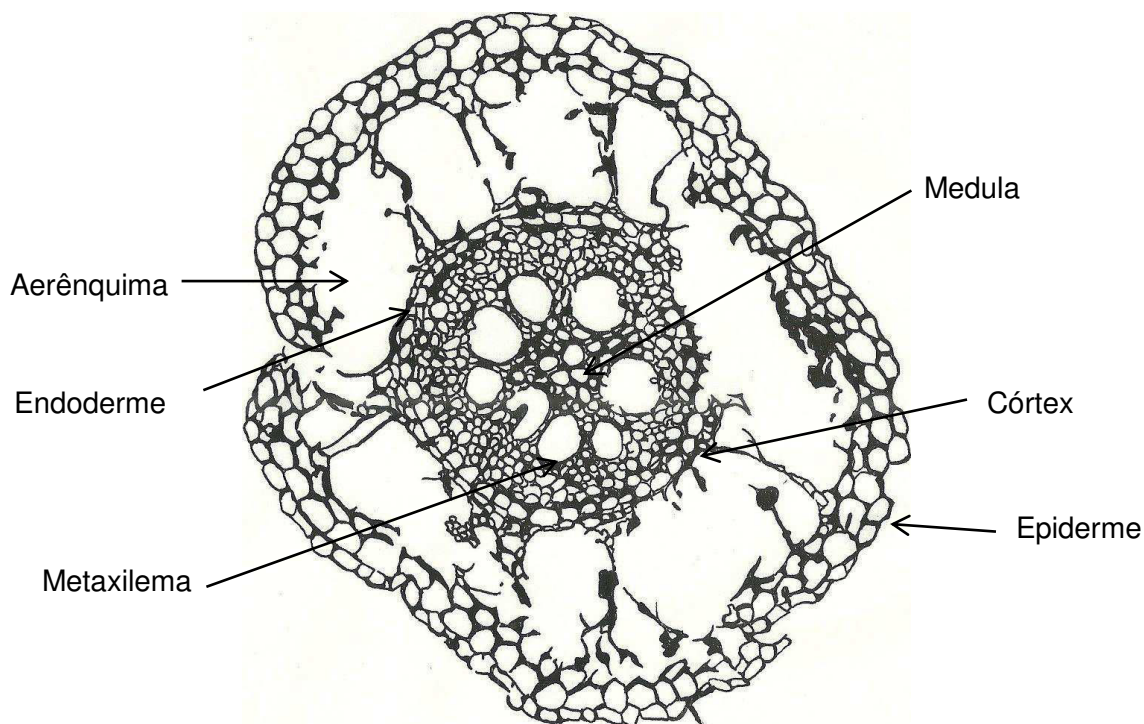


Figura 16: Raiz de cana-de-açúcar em condições normais de crescimento (1g). Esquema apresentando características anatômicas de seção transversal de raiz de cana-de-açúcar.



As imagens de seção transversal de folhas das plantas que foram expostas ao voo no foguete de sondagem nas orientações vertical e horizontal apresentaram uma evidente deformação das células, especialmente as células buliformes, que se apresentam aumentadas em relação à planta controle. Observa-se, também, espessamento da epiderme em todas as plantas que sofreram alteração da gravidade e da bainha de Kranz nas plantas que cresceram em condições normais de gravidade após o voo no foguete de sondagem, bem como em seus perfilhos em relação ao controle.

Nas raízes das plantas submetidas ao voo no foguete de sondagem nas orientações vertical, horizontal e crescida em substrato sem qualquer exposição à microgravidade (planta controle), não se observa diferenças no tocante a espessamento ou lignificação em paredes celulares. Contudo, as plantas submetidas ao voo no foguete VSB 30 tiveram um aumento no número de elementos de metaxilema, e muitas vezes, desorganização desses feixes. Muitos cortes de raízes apresentaram regiões quebradiças, resultantes de um aumento na área de aerênquima. Embora existam diferenças nas imagens abaixo quanto às raízes das plantas fixadas horizontal e verticalmente na caixa, é importante salientar que o aumento e desorganização de metaxilema e fragilidade da estrutura radicular foi observado para ambos os grupos horizontal e vertical.

Outro corante utilizado, safranina, cora paredes secundárias lignificadas em tons de vermelho. Como já expresso anteriormente nos resultados da coloração com azul de toluidina, observou-se que as células buliformes apresentaram-se mais volumosas na lâmina foliar de plantas que foram submetidas ao voo no foguete em ambas as posições de fixação: vertical e horizontal. Visualizou-se, também, em todas as plantas que foram submetidas ao voo no VSB-30, uma coloração em vermelho mais forte nas células epidérmicas, que se mostraram mais espessadas, semelhante ao resultado com azul de toluidina. Plantas pertencentes ao grupo controle apresentaram a organização padrão dos feixes vasculares de gramíneas e um menor conteúdo de paredes lignificadas.

No tocante às raízes das plantas submetidas ao voo espacial nas orientações vertical, horizontal e crescida em substrato sem qualquer exposição à microgravidade, não foi observada diferenças em relação ao processo de lignificação das paredes. A desorganização e aumento no número de elementos de metaxilema, bem como aumento da área de aerênquima também foi verificado nos cortes histológicos corados com safranina.

As lâminas temporárias, assim chamadas em função da utilização de corantes não duráveis (cloreto de zinco iodado e DAB), também apresentaram alterações contrastantes entre as plantas que sofreram a ação da microgravidade e

aquelas que nunca passaram por alterações na gravidade (controle). O cloreto de zinco iodado fornece uma coloração temporária para as estruturas, apenas durante o tempo em que a reação ocorre, e cora celulose (de azul-acinzentado), lignina (de amarelo-acastanhado) e amido (de preto) (KRAUS & ARDUIN, 1997).

As folhas de cana-de-açúcar submetidas ao voo no foguete VSB-30 e fixadas ao suporte na orientação vertical apresentaram, em cortes de seção transversal corado com cloreto de zinco iodado, um maior conteúdo de lignina (coloração amarelo-acastanhado) ao longo da estrutura Kranz (indicada nas setas) enquanto que aquelas fixadas na orientação horizontal e as que cresceram na Terra um ano após o voo mostraram maior deposição de grânulos corados que indicam a presença de amido nas células que compõem a anatomia Kranz. Os perfilhos e as plantas do grupo controle, que não passaram por nenhuma mudança de gravidade, apresentaram menor lignificação.

As raízes das plantas submetidas ao voo a bordo do foguete apresentaram maior conteúdo de lignina (coloração amarelo-acastanhado) na região do córtex quando comparadas com plantas do grupo controle.

Outro tipo de coloração temporária utilizada nas amostras do presente trabalho foi o diaminobenzidina (DAB), que identifica acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), visualizado através de coloração marrom-avermelhada nos tecidos vegetais. A revelação dos tecidos foliares com DAB revelou a deposição de H_2O_2 tanto nas plantas expostas à microgravidade quanto naquelas que cresceram em gravidade normal após o voo e nos perfilhos. As folhas das plantas do grupo controle apresentaram uma menor coloração relativa a H_2O_2 .

4.3.2 – Análise por microscopia eletrônica de varredura

Foram realizadas análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV), gerando imagens em alta definição da superfície de raízes e folhas das plantas que sofreram alteração de gravidade através do voo no foguete VSB-30 nas orientações vertical e horizontal, assim como daquelas que cresceram por um ano na Terra após o voo e seus perfilhos. Também foram analisadas amostras de folhas e raízes das

plantas que cresceram na gravidade 1g (Terra) e não sofreram qualquer exposição à microgravidade.

As análises no MEV demonstraram que as plantas que participaram do voo no foguete de sondagem sofreram alterações significativas em sua estrutura. As plantas de cana-de-açúcar, tal como demais membros da família Poaceae, apresentam em suas folhas uma organização de feixes vasculares de maneira alternada e organizada. Tal organização foi verificada nas plantas pertencentes ao grupo controle, enquanto que naquelas submetidas à microgravidade nas orientações vertical e horizontal detectou-se um padrão de disposição irregular desses feixes vasculares. Tal irregularidade também foi constatada nas análises de microscopia eletrônica nos indivíduos que foram submetidos à microgravidade e posteriormente replantados em gravidade terrestre, e nos perfilhos de plantas deste grupo.

As plantas que passaram pelos seis minutos de microgravidade a bordo do foguete VSB-30, apresentaram alterações morfológicas semelhantes no sistema radicular. Nas plantas submetidas à microgravidade em ambas as orientações vertical e horizontal, bem como naquelas que cresceram na gravidade 1g por um ano após o voo e seus perfilhos observou-se um aumento pronunciado das células da epiderme, as quais apresentaram tamanhos irregulares. Observou-se, ainda, maior desenvolvimento dos polos de metaxilema nas plantas que passaram por um período de microgravidade e nos perfilhos de indivíduos que foram expostos ao voo em relação àquelas do grupo controle.

4.4 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Uma vez que estudos anteriores relacionaram a microgravidade com estresse oxidativo, foram realizados ensaios de atividades de enzimas do sistema antioxidante de plantas (superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase) para avaliar possíveis alterações.

4.4.1 – Superóxido dismutase (SOD)

A atividade de superóxido dismutase foi determinada pela capacidade dessa enzima em inibir a redução do azul de nitrotetrazólio (NBT), sendo uma unidade de

SOD a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT. Os resultados obtidos através da análise de atividade enzimática de superóxido dismutase mostraram um aumento da atividade dessa enzima em amostras de folhas submetidas à microgravidade - tanto na orientação horizontal como na vertical - quando comparadas com o grupo controle de plantas que ficaram na caixa hermeticamente fechada, mas sem qualquer mudança nas plantas submetidas a gravidade terrestre (controle caixa).

Os tecidos foliares das plantas submetidas ao voo no VSB-30 em ambas as orientações, vertical e horizontal, apresentaram atividade de superóxido dismutase maior do que as plantas do grupo controle.

Para os tecidos radiculares, observou-se o inverso do que ocorreu em folhas: nas plantas submetidas à microgravidade em ambas as orientações horizontal e vertical a atividade de SOD foi menor do que das plantas do grupo controle.

4.4.2 – Catalase (CAT)

A atividade enzimática da catalase foi determinada através da análise do decaimento de absorvância em 240 nm. Em folhas de cana-de-açúcar submetidas à microgravidade, a atividade de CAT foi baixa. Não houve diferença significativa da atividade de CAT entre as plantas submetidas ao voo, considerando as duas orientações de fixação na caixa, nem entre o grupo controle e as plantas expostas ao ambiente de microgravidade na orientação horizontal. Para as raízes, não foi detectada atividade de catalase em amostras de nenhum grupo analisado nesse trabalho.

4.4.3 – Ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da ascorbato peroxidase foi avaliada através do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. A análise da atividade dessa enzima em folhas mostrou que não houve qualquer diferença significativa entre plantas submetidas à microgravidade e aquelas do grupo controle.

Para o sistema radicular de plantas submetidas à microgravidade, observou-se que a atividade de ascorbato peroxidase foi menor quando comparado com as plantas do grupo controle. Não foi observada diferença significativa entre as plantas dispostas horizontal ou verticalmente no suporte durante o voo espacial.

As análises das atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em tecidos foliares e radiculares resultaram no entendimento de que a microgravidade pode ter afetado o sistema antioxidante das plantas, de maneira tecido específica, haja vista as alterações nas atividades de SOD em folhas e APX e SOD em raízes.

5 – DISCUSSÃO

Os estudos acerca da resposta dos vegetais à microgravidade real são escassos e limitam-se a pesquisas utilizando células vegetais ou captura de imagens de plantas em estações espaciais, sem o retorno das amostras para análises mais aprofundadas. Dessa forma, não há sequer um consenso sobre como funciona o crescimento das plantas no espaço. Recentemente, os esforços no intuito de desvendar os efeitos da microgravidade em vegetais possibilitaram a obtenção de alguns dados moleculares acerca da expressão diferencial de diversos genes em culturas de células de planta e da relação entre fototropismo e gravitropismo (PAUL *et al.*, 2012; KISS *et al.*, 2012; ZUPANSKA *et al.*, 2012; MARTZIVANOU *et al.*, 2006). Contudo, esses estudos estão restritos a células ou plântulas de *Arabidopsis thaliana*, planta-modelo em estudos de genética, pertencente à classe das eudicotiledôneas. Assim, os resultados acerca dos efeitos da microgravidade em plantas de cana-de-açúcar, acima expostos, podem auxiliar na compreensão de como as plantas são afetadas pela microgravidade, dessa vez considerando uma planta monocotiledônea de valor econômico.

Alterações macroscópicas puderam ser percebidas na planta que passou um ano crescendo em solo terrestre após o voo espacial, a exemplo de espessamento das folhas e uma sutil mudança na coloração, passando de um tom de verde mais claro para um mais escuro. Contudo, foi necessário investigar se o ambiente de microgravidade foi capaz de provocar, também, alterações estruturais em nível microscópico. Para isso, foram realizadas as análises anatômicas com corante específicos, que evidenciam o acúmulo de substâncias como peróxido de hidrogênio, amido e lignina, bem como a estrutura e organização dos vasos.

Cortes com colorações de cloreto de zinco iodado, safranina e azul de toluidina apresentaram um aumento no conteúdo de lignina na parede celular de folhas e raízes. A lignina é, depois da celulose, o segundo biopolímero mais abundante na natureza e a capacidade das plantas de sintetizá-lo foi essencial para a adaptação evolucionária de um ambiente aquático para o terrestre (RAES *et al.*, 2003). A lignina é um heteropolímero aromático composto por diferentes fenilpropanóides e que está presente na parede celular secundária de plantas, promovendo rigidez, impermeabilização e prevenindo dessecação das células, além

de conferir proteção dos tecidos vegetais contra invasão de patógenos (BOERJAN *et al.*, 2003). Tais funções são essenciais para as plantas, já que estas são organismos sésseis e, por isso, precisam de uma maior plasticidade no tocante à defesa contra fatores bióticos e abióticos, a exemplo da produção de metabólitos secundários que conferem resistência a condições ambientais adversas (RAMAKRISHNA & RAVISHANKAR, 2011).

A biossíntese de lignina é dependente de uma complexa rede genética, na qual diferentes enzimas participam em resposta a variados tipos de estresse, sejam eles bióticos ou abióticos. Sendo assim, o controle da biossíntese de lignina dá-se por meio da atividade de diversos reguladores transcricionais integrados a sinais endógenos e exógenos. Contudo, Rogers & Campbell (2004) acreditam que, embora existam diferentes genes envolvidos nessa via de biossíntese de lignina, deve haver um regulador central, o qual pode ser identificado através da comparação de análises de transcriptômica de mutantes com disposição de lignina alterada quando comparada com as plantas selvagens. Canabé *et al.*, (2004) comprovaram a relação da síntese de lignina com a intensidade do estresse através da exposição de folhas de álamo a um tratamento com ozônio e concluíram que o aumento da atividade de enzimas envolvidas na síntese de lignina foi dependente da dose de ozônio aplicada. Bok Rye *et al.*, (2007) relataram um aumento de lignina em *Trifolium repens* (trevo branco) submetido à estresse hídrico. Fatores bióticos, como ataque de bactérias, também contribuem para o processo de lignificação, como demonstram Zhang *et al.* (2007), que submeteram plantas de *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (repolho chinês) ao contato com bactérias *Erwinia carotovora* e verificaram aumento no conteúdo de lignina nas paredes celulares, de modo a impedir a entrada e proliferação do patógeno. Anomalias no conteúdo de lignina também podem ser observadas em casos de deficiência ou concentrações elevadas de nutrientes (MOURA *et al.*, 2010).

Ainda concernente às análises histológicas, desta vez através da coloração com cloreto de zinco iodado, podemos observar o acúmulo de amido nas plantas que foram submetidas à microgravidade, mesmo naquela que passou um ano crescendo na gravidade normal após o voo. A ocorrência das manchas escuras indica a presença de amido, substância sintetizada nos cloroplastos e constituída

por dois polímeros de glicose, a saber: amilopectina (molécula grande, responsável pela natureza granular do amido) e amilose (menor, sintetizada na matriz formada pela amilopectina). O amido é um produto primário da fotossíntese e importante componente de reserva energética, além de ser constituinte do sistema de percepção de gravidade nas plantas (KRIEGS *et al.*, 2006; ZEEMAN *et al.*, 2007).

O amido desempenha funções importantes no tocante à manutenção do metabolismo vegetal, por isso, sua regulação é tão influenciada por fatores ambientais (STRAND *et al.*, 1997; ZEEMAN *et al.*, 2004a; MOHAMMADKHANI & HEIDARI, 2008; DKHIL & DENDEN, 2010; VASSEY & SHARKEY, 1989; CORBESIER *et al.*, 1997). O acúmulo observado nos resultados apresentados acima pode estar associado com alterações em enzimas que metabolizam amido, como isoformas plastidiais de fosforilases e pode ser relacionado com outros eventos de estresse em plantas, como o salino e o hídrico (SOUZA *et al.*, 2011; STREB & ZEEMAN, 2012; ZEEMAN *et al.*, 2004b). A síntese de amido é regulada por fosforilação reversível de proteínas e formação de complexos proteicos, mas ainda não está claro como ocorre a integração da rede de sinalização intracelular que funciona como sensor de sinais ambientais e metabólicos (GEIGENBERGER, 2011). Não é possível esclarecer se houve, de fato, um aumento no conteúdo de amido nas plantas de cana-de-açúcar submetidas a condição de microgravidade, uma vez que não foi realizada nenhuma análise de quantificação. Pode ter ocorrido uma alteração na mobilização de amido, por isso sendo observado na coloração das laminas com cloreto de zinco iodado.

A radiação no espaço, guiada principalmente por partículas de raios cósmicos galácticos e de explosões solares, foi mensurada por equipamentos que medem, em tempo real, a transferência linear de energia, sendo estimada em 1 milisievert (mSv) por dia, o que consiste em um valor quase mil vezes maior do que aquele da superfície terrestre. Isto acontece porque nosso planeta dispõe da camada de ozônio, campo magnético e da atmosfera para reduzir drasticamente o nível de radiação oriunda do espaço (DOKE *et al.*, 2001).

Dessa forma, a microgravidade associada aos componentes de radiação espacial mencionados acima podem constituir fatores estressantes adicionais que

levam ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, como o H_2O_2 nos tecidos vegetais, levando a planta a uma alteração em seu estado redox. A superóxido dismutase está envolvida na formação localizada de peróxido de hidrogênio que, por sua vez, tem um papel crítico na sinalização da lignificação celular. O acúmulo de H_2O_2 contribui, portanto, para modificações de propriedades mecânicas da parede celular durante a aclimação ao estresse, influenciando a diferenciação do xilema e a lignificação. O peróxido é utilizado para oxidação de álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico formando lignina; H_2O_2 é, ainda, um sinalizador que ativa a transcrição de enzimas envolvidas na biossíntese de lignina, como fenilalanina amônia liase e peroxidases. Essa relação de aumento da atividade de SOD e do processo de lignificação já foi verificada em plantas de *A. thaliana* submetidas a estresse salino (GILL *et al.*, 2010; DONNINI *et al.*, 2010). Assim, os resultados morfofisiológicos e enzimáticos parecem se encontrar e ratificar que a microgravidade pode ser considerada um tipo de estresse abiótico.

Para investigar de maneira mais profunda as alterações anatômicas decorrentes da microgravidade, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) nessas plantas. Como pode ser observado nos resultados supracitados, houve uma profunda desorganização estrutural nas plantas submetidas à microgravidade, onde não pôde ser verificada a alternância regular dos feixes vasculares, comum às gramíneas. Uma vez que as células que compõem as epidermes superiores e inferiores formam a primeira camada de contato da planta com o ambiente externo (ESAU, 1976), pode-se atribuir o seu espessamento à existência de uma condição de estresse, no caso, a microgravidade. Foram observadas, também, células buliformes avantajadas, especialmente nas plantas que foram fixadas logo após o voo. As células buliformes são um tipo de célula epidérmica volumosa que é característica de gramíneas e está associada ao enrolamento e desenrolamento das folhas, sendo, portanto, uma célula “motora” (ESAU, 1976). O aumento dessas células pode ser o motivo pelo qual as folhas dessas plantas tenham ficado consideravelmente frágeis, dificultando a realização dos cortes histológicos.

As raízes das plantas que sofreram alteração da gravidade também apresentaram desorganização dos vasos, especialmente no tocante ao aumento de

elementos de metaxilema em comparação com o controle. Essa alteração anatômica no sistema radicular já foi relacionada a casos de estresse de cultivares de soja por fornecimento de doses excessivas de manganês, micronutriente essencial para plantas (LAVRES-JUNIOR *et al.*, 2009). O desenvolvimento da raiz é determinado geneticamente, mas também é regulado por fatores ambientais, a exemplo de processos de lignificação que conferem maior resistência da estrutura radicular para que a planta sobreviva às condições adversas do ambiente (YANG *et al.*, 2012).

Diversos estudos contemplam a análise das atividades de enzimas antioxidantes nas mais variadas espécies de plantas, especialmente em folhas, relacionando alterações nessas atividades com a exposição a diferentes fatores estressantes (BOR *et al.*, 2003). A privação de água em milho (*Zea mays* L.) resultou em um maior conteúdo de EROs, como superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na planta e um aumento nas atividades de enzimas que compõem o sistema antioxidante em plantas, como CAT, SOD e APX (JIANG & ZHANG, 2002); o tratamento com ABA em *Stylosanthes guianensis* também culminou em maior atividade das enzimas ora citadas (ZHOU *et al.*, 2005).

Os dados de atividades enzimáticas apontaram um aumento na atividade de superóxido dismutase (SOD) nas folhas das plantas expostas à microgravidade. Por outro lado, em raízes, a atividade de SOD e ascorbato peroxidase (APX) foi menor em relação aos grupos controles. Divergências entre atividade enzimática antioxidante entre folhas e raízes de plantas já foram relatadas em outros trabalhos: plantas de feijão caupi expostas a altas concentrações de NaCl apresentaram atividades de SOD e CAT diferentes nas folhas e raízes (CAVALCANTI *et al.*, 2007); a atividade de SOD em *Pisum sativum* submetidas a tratamento de hidroponia com cádmio e *Sorghum bicolor*, exposto à altas concentrações de cromo também foi discrepante entre folhas e raízes (DIXIT *et al.*, 2001; SHANKER & PATHMANABHAN, 2004).

Estudos anteriores revelaram uma forte associação entre microgravidade e EROs: Barjaktarovic *et al.* (2007) encontraram em seus estudos de proteômica, utilizando culturas de células de *A. thaliana* submetidas à microgravidade e hipergravidade simuladas, algumas proteínas envolvidas na eliminação de EROs. (BARJAKTAROVIC *et al.*, 2007 e 2009). A conclusão desses estudos foi de que

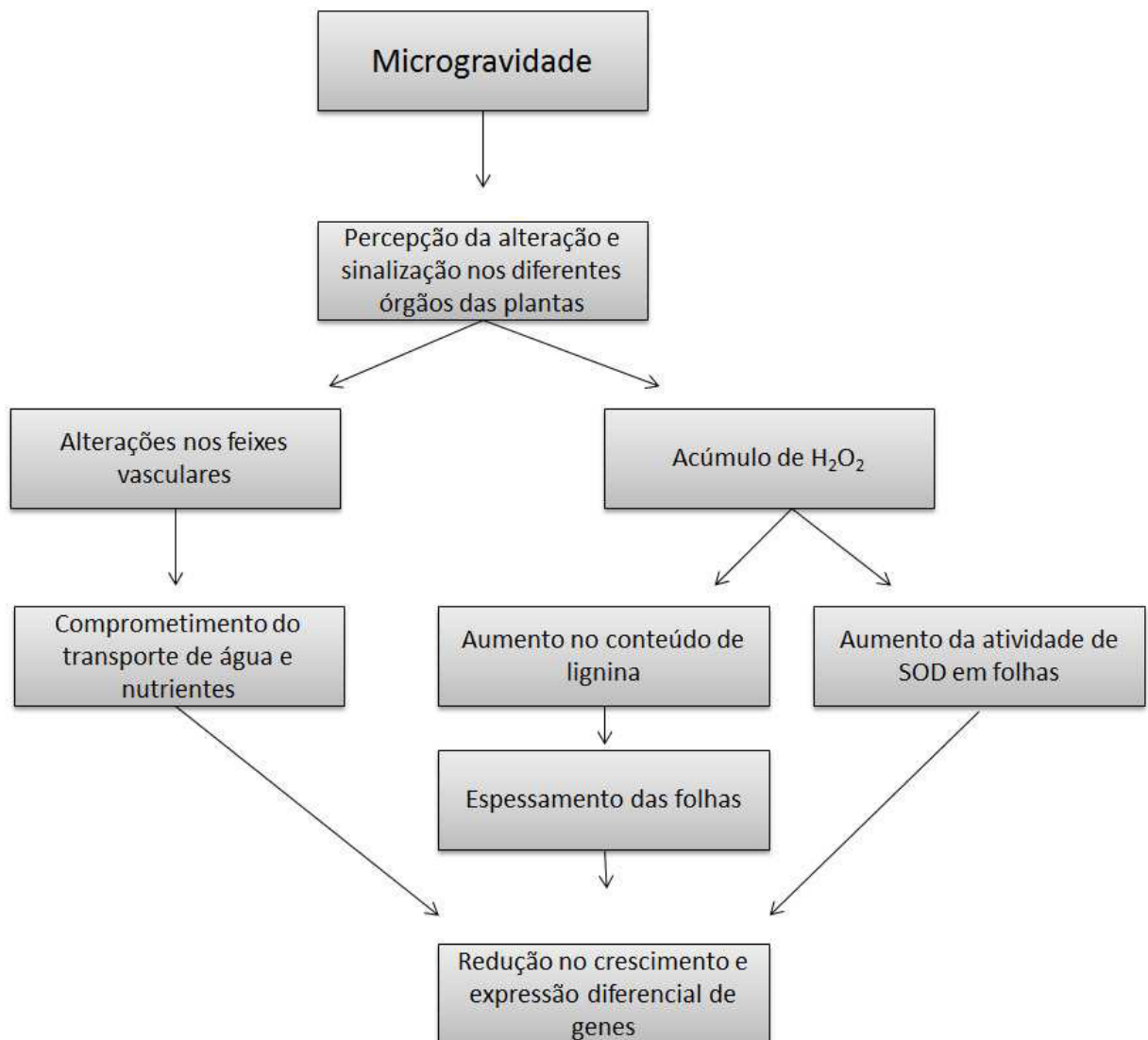
mudanças na força gravitacional induziram um estresse oxidativo. Contudo, embora seja aparentemente óbvia, essa conclusão pode ser equivocada. Muitas pesquisas apostaram que os organismos capazes de remover EROs teriam mais chances de sobreviver às condições desfavoráveis, mas esse dualismo antioxidante-EROs é simplista parece desconsiderar as funções dessas espécies como moléculas sinalizadoras (LOIACONO *et al.*, 2012; MILLER *et al.*, 2010). A maioria, se não todas, as condições que impõem restrições no crescimento e desenvolvimento da planta (estresse) envolvem, em maior ou menor grau, ajustes no estado redox e essas interações redox desempenham um papel fundamental na orquestração de respostas a estresse abiótico, regulando, inclusive a morte celular programada através da integração de EROs com fatores pro e anti apoptóticos (FOYER *et al.*, 2005a; NOCTOR, 2006).

O aumento na produção de EROs, outrora caracterizado como um processo prejudicial que levava a planta ao estresse oxidativo, muitas vezes pode significar o contrário, já que o aumento da oxidação é um componente essencial do repertório de sinais que a planta usa pra modular a expressão gênica e a estrutura celular em resposta a determinadas condições ambientais. Embora a oxidação de proteínas e outras moléculas possam contribuir para a redução do vigor da planta, é cada vez mais evidente que isso faz parte da percepção e resposta a estímulos do ambiente (FOYER *et al.*, 2005b). Dessa forma, diferente do que era esperado para esse trabalho (em função das pesquisas anteriores), não é possível afirmar que a planta estava sob condição de estresse oxidativo; o que foi observado em relação às atividades de enzimas antioxidantes e ao acúmulo de H₂O₂ pode ser uma evidência da ocorrência de sinalização para defesa contra a condição adversa, no caso, a microgravidade. Essas modificações podem ser consideradas essenciais para que as plantas respondam de maneira adequada, induzindo mecanismos de proteção e aclimatação, como a lignificação (Figura 32).

Os dados apresentados nesse trabalho são pioneiros na pesquisa acerca das análises morfofisiológicas, enzimáticas e moleculares sobre microgravidade real em plantas. Além das informações aqui contidas, a pesquisa agregará resultados que serão obtidos com o sequenciamento através da plataforma Illumina, os quais ajudarão a esclarecer como as plantas respondem a esta condição. Essas

informações adicionais irão auxiliar na descoberta de semelhanças e diferenças entre respostas de plantas monocotiledôneas, como a cana-de-açúcar, e eudicotiledônias, como o modelo *Arabidopsis* para que, dessa forma, seja possível identificar uma rede regulatória comum entre as plantas, além das peculiaridades de cada classe.

Figura 17: Respostas das plantas à microgravidade: esquema apresentando os resultados encontrados após a exposição de plantas de cana-de-açúcar à condições de microgravidade através do voo em um foguete modelo VSB-30.



6 – CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se afirmar que a submissão de plantas ao voo no foguete de sondagem e à microgravidade real foi um fator desencadeante para a ocorrência de alterações anatômicas, especialmente aumento no processo de lignificação e desorganização estrutural dos tecidos vasculares em folhas e raízes, influenciando, pois, o seu desenvolvimento. Verificou-se, ainda, que essas plantas apresentaram alterações nas atividades enzimáticas antioxidantes (SOD e APX) e que a utilização do sequenciamento de nova geração com a plataforma Solexa/Illumina foi capaz de gerar dados de qualidade que serão analisados posteriormente.

REFERÊNCIAS

- ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Curr. Sci.**, 82: 1227-1238.
- BARJAKTAROVIC, Z., SCHUTZ, W., MADLUNG, J., FLADERER, C., NORDHEIM, A., AND HAMPP, R. 2009. Changes in the effective gravitational field strength affect the state of phosphorylation of stress-related proteins in callus cultures of *Arabidopsis thaliana*. **J Exp Bot.**, 60: 779–789.
- BARJAKTAROVIC, Z.; NORDHEIM, A.; LAMKEMEYER, T.; FLADERER, C.; MADLUNG, J.; HAMPP, R. 2007. Time-course of changes in amounts of specific proteins upon exposure to hyper-g, 2-D clinorotation, and 3-D random positioning of *Arabidopsis* cell cultures. **J Exp Bot.**, 58: 4357-4363.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. 2003. Lignin biosynthesis. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 54: 519–46.
- BOK-RYE, L.; KIM, K.Y.; JUNG, W.J.; AVICE, J.C.; OURRY, A.; KIM, T.H. 2007. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). **Journal of Experimental Botany**, 58: 1271–1279.
- BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, 164: 77-84.
- BORÉM, A.; MILACH, S.K. 1999. O melhoramento de plantas na virada do milênio. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 7: 68-72.
- BORODINA, E.V.; TIRANEN, L.S. 2003. High temperature effect on microflora of radish root-inhabited zone and nutrient solutions for radish growth. **Adv Space Res.**, 31(1): 235-240.
- BULBENHEIM DL, STIEBER J, CAMPBELL WF, SALISBURY FB, LEVINSKI M, SYTCHEV V, PODOLSKY I, CHERNOVA L, PDOLSKY I. 2003. Induced abnormality in Mir- and Earth grown Super Dwarf wheat. **Adv Space Res.**, 31(1): 229-234.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254.
- CABANÉ, M.; PIREAUX, J.; LÉGER, E.; WEBER, E.; DIZENGREMEL, P.; POLLET, B.; LAPIERRE, C. 2004. Condensed Lignins Are Synthesized in Poplar Leaves Exposed to Ozone. **Plant Physiology**, 134: 586–594

CAMPBELL, W.F.; SALISBURY, F.B.; BUGBEE, B.; KLASSEN, S.; NAEGLE, E.; STRICKLAND, D.T.; BINGHAM, G.E.; LEVINSKIKH, M.; ILJINA, G.M.; VESELOVA, T.D.; SYTCHEV, V.N.; PODOLSKY, I.; MCMANUS, W.R.; BUBENHEIM, D.L.; STIEBER, J.; JAHNS, G. 2001. Comparative floral development of Mir-grown and ethylene-treated, earth-grown Super Dwarf wheat. **J Plant Physiol.**,158(8): 1051-1060.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. 2010. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, 40: 735-744.

CAVALCANTI, F.R.; LIMA, J.P.M.S.; FERREIRA-SILVA, S.J.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. 2007. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology**, 164: 591-600.

CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. 2008. Effect of osmotic stress on proline accumulation, photosynthetic abilities and growth of sugarcane plantlets (*Saccharum officinarum* L.). **Pak. J.Bot.**, 40: 2541-2552.

CHEN, R.; ROSEN, E.; MASSON, P.H. 1999. Gravitropism in higher plants. **Plant Physiol**, 120: 343–350.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.K. 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, 12:1-7.

CONAB. Central de informações agropecuárias. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 29 dez 2012.

COOK, M. E.; CROXDALE, J. L. 2003. Ultrastructure of potato tubers formed in microgravity under controlled environmental conditions. **Journal of Experimental Botany**, 54: 2157–2164.

CORBESIER, L.; LEJUNE, P.; BERNIER, G. 1998. The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutante. **Planta**, 206: 131-137.

DAYANANDAN, P. 2011. Gravitational biology and space life sciences: Current status and implications for the Indian space programme. **J. Biosci.**, 36: 1–9.

DARWIN, C. **The Power of Movement in Plants.** London: John Murray, 1880.

DIXIT, V.; PANDEY, V.; SHYAM, R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). **J. Exp. Bot.**, 52: 1101-1109.

DONNINI, S.; DELL'ORTO, M.; ZOCCHI, G. 2010. Oxidative stress responses and root lignification induced by Fe deficiency conditions in pear and quince genotypes. **Tree Physiology**, 31: 102-113.

DOKE, T.; HAYASHI, T.; KIKUCHI, J.; SAKAGUCHI, T.; TERESAWA, K.; YOSHIHARA, E.; NAGAOKA, S.; NAKANO, T.; TAKAHASHI, S. 2001. Measurements of LET-distribution, dose equivalent and quality factor with the RRMD-III on the Space Shuttle Missions STS-84, -89 and -91. **Radiation Measurements**, 33: 373–387.

DKHIL, B.B.; DENDEN, M. 2010. Salt stress induced changes in germination, sugars, starch and enzyme of carbohydrate metabolism in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench seeds. **African Journal of Agricultural Research**, 5(6): 408-415.

D'HONT, A.; GLASZMAN, J. C. 2001. Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. **Proceedings of the International Society for Sugar Cane Technology**, 24: 556–559.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blücher, 1976.

EVANS, D.E. 2003. Aerenchyma formation. **New phytologist**, 161: 35-49.

EWING, B.; GREEN, P. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, 8:186-194.

FAOSTAT: FAO Statistical Databases. Disponível em:<<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 27 dez 2012.

FIRMINO, A.; ABREU, H.S.; PORTUGAL, A.C.P.; NASCIMENTO, A.M.; SOUZA, E.L.; PEREIRA, P.W.; MONTEIRO, M.B.O.; MAËDA, J.M. 2006. Alterações ligno-anatômicas em *Solanum gilo* raddi por aplicação de cálcio e boro como estratégia de defesa. **Ciênc. agrotec.**, 30: 394-401.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. 2005a. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. **Plant Cell**, 17: 1866-1875.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. 2005b. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, 28: 1056-1071.

GEIGENBERGER, P. 2011. Regulation of Starch Biosynthesis in Response to a Fluctuating Environment. **Plant Physiology**, 155: 1566–1577.

GIBA, Z.; TODORVIÜ, S.; GRUBIŠIÜ, D.; KONJEVIÜ, R. 1998. Occurrence and regulatory roles of superoxide anion radical and nitric oxide in plants. **Physiol. Pharmacol. Acta**, 34: 447-461.

GILL, T.; SREENIVASULU, Y.; KUMAR, S.; AHUJA, P.S. 2010. Over-expression of superoxide dismutase exhibits lignification of vascular structures in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**, 167: 757-760.

GILROY, S.; BETHKE, P.C.; JONES, R.L. 1993. Calcium homeostasis in plants. **J Cell Sci.**, 106: 453-461.

GRAÇA, J.P. Avaliação de parâmetros fisiológicos em cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico. Dissertação (Mestrado) - **Universidade Estadual Paulista**, Jaboticabal, 2009.

GRENE, R. 2002. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. **The Arabidopsis Book**, 49: 1-20.

HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol.**, 84: 450-455.

HOSHINO, T.; MIYAMOTO, K.; UEDA, J. 2007. Gravity-controlled asymmetrical transport of auxin regulates a gravitropic response in the early growth stage of etiolated pea (*Pisum sativum*) epicotyls: studies using simulated microgravity conditions on a three-dimensional clinostat and using an agravitropic mutant, *ageotropum*. **J. Plant Res.**, 120: 619-628.

HUSSAIN, A.; KHAN, Z.I.; GHANFOOR, M.Y.; ASHRAF, M.; PARVEEN, R.; RASHID, M.H. 2004. Sugarcane, sugar metabolism and some abiotic stresses. *Int. J. Agri. Biol.*, 6: 732-742.

JIANG, M.; ZHANG, J. 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, 53: 2401-2410.

KALININA, I. 2008. Microtubules spatial alterations in root cells of *Brassica rapa* under clinorotation. **Cell biology international**: 581-583.

KITAYA, Y.; KAWAI, M.; TSURUYAMA, J.; TAKAHASHI, H.; TANI, A.; GOTO, E.; SAITO, T.; KIYOTA, M. 2003. The effect of gravity on surface temperatures of plant leaves. **Plant Cell Environ.**, 26(4):497-503.

KISS, J.Z.; MILLAR, K.D.L.; EDELMANN, R.E. 2012. Phototropism of *Arabidopsis thaliana* in microgravity and fractional gravity on the International Space Station. **Planta**, 236: 635-645.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Editora Universidade Rural, 1997.

KRIGES, B.; THEISEN, R.; SCHNABL, H. 2006. Inositol 1,4,5-trisphosphate and Ran expression during simulated and real microgravity. **Protoplasma**, 229: 163-174.

LAVRES-JUNIOR, J.; MALAVOLTA, E.; NOGUEIRA, N.L.; MORAES, M.; REIS, A.R.; ROSSI, M.L.; CABRAL, C.P. 2009. Changes in anatomy and root cell ultrastructure of soybean genotypes under manganese stress. **R. Bras. Ci. Solo**, 33: 395-403.

LOIACONO, F.V.; DE TULLIO, M.C. 2012. Why We Should Stop Inferring Simple Correlations Between Antioxidants and Plant Stress Resistance: Towards the Antioxidomic Era. **OMICS**, 16(4): 160-167.

MAIER, R.M.; MARTZIVANOU, M.; MAGEL, E.; ZHENG, H.; COGOLI-GREUTER, M.; HAMPP, H. 2003. Anaplerotic responses of *Arabidopsis thaliana* cell cultures to altered gravitational field strength. In: 16th ESA Symposium on European Rocket and Balloon Programmes and Related Research: 253-258.

MANIATIS, R.; FRITSCH, E.G.; SAMBROOK, J. 1987. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

MARTZIVANOU, M.; HAMPP, R. 2003. Hyper-gravity effects on the *Arabidopsis* transcriptome. **Physiologia Plantarum**, 118: 221–231.

MARTZIVANOU, M.; BABBICK, M.; COGOLI-GREUTER, M.; HAMPP, R. 2006. Microgravity-related changes in gene expression after short-term exposure of *Arabidopsis thaliana* cell cultures. **Protoplasma**, 229(2-4): 155-162.

MENOSSI, M.; SILVA-FILHO, M.C.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M.A.; SOUZA, G.M. 2007. Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. **International Journal of Plant Genomics Article**, 2008: 1-11.

MILLER, B.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZI, S.; MITTLER, R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, 33: 453-467.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, K. M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. 2004. Reactive oxygen gene network of Plants. **Trends Plant Sci.**, 09: 490–498.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V.B.; VANDEPOELE, GOLLERY, K. M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. 2011. ROS signaling: the new wave? **Trends Plant Sci.**, 16: 300–309.

MOHAMMADKHANI, N.; HEIDARI, R. 2008. Drought-induced Accumulation of Soluble Sugars and Proline in Two Maize Varieties. **World Applied Sciences Journal**, 3(3): 448-453

MOORE, P.H. 1995. Temporal and spatial regulation of sucrose accumulation in the sugarcane stem. **Australian Journal Of Plant Physiology**, 22(4): 661–679.

MOURA, J.C.M.S.; BONINE, C.A.V.; VIANA, J.O.F.; DORNELAS, M.C.; MAZZAFERA, P. 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. **J. Integr. Plant Biol.**, 52(4): 360–376.

NAKANO, Y.; ASADA, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant cell physiology**, 5: 867-880.

NETTO, L.E.S. 2001. Oxidative stress response in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, 24 (1-4): 93-102.

NOCTOR, G. 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. **Plant Cell Environ**, 29: 409–425.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. 1964. Polyehromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, 59: 368-373

PAUL, A.L.; AMALFITANO, C.E.; FERL, R.J. 2012. Plant growth strategies are remodeled by spaceflight. **BMC Plant Biology**.

PATEL, R.K.; JAIN, M. 2012. NGS QC Toolkit: A Toolkit for quality control of next generation sequencing data. **PlosOne**, 7(2): 1-7.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'Anna, R.; MUSQUIM, R.; MOREIRA, M.A. 1999. Aluminium effect on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 11: 137-143.

PEREIRA, I.Y.; HEILMANN, I.; BOSS, W.F. 1999. Transient and sustained increases in inositol 1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gravistimulated maize pulvini. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96: 5838-5843.

PERRIN, R.M.; YOUNG, L.; MURTHY, U.M.N.; HARRISON, B.R.; WANG, Y.; WILL, J.L.; MASSON, P.H. 2005. Gravity Signal Transduction in Primary Roots. **Annals of botany**, 96: 737-743.

PLIETH, C.; TREWAVAS, A.J. 2002. Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. **Plant Physiology**, 129: 786-796.

RAES, J.; ROHDE, A.; CHRISTENSEN, J.H.; VAN DE PEER, Y.; BOERJAN, W. 2003. Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in Arabidopsis. **Plant Physiology**, 133: 1051–1071.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G.A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav.*, 6(11): 1720-1731.

REITZ, G. 2000. Biological effects of space radiation. DLR, Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin, Abteilung Strahlenbiologie, D-51140 Köln.

ROGERS, L.A.; CAMPBELL, M.M. 2004. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. **New Phytologist**, 164: 17–30.

ROGERS, M.J.B.; VOGT, G.L.; WARGO, M.J. 1997. Microgravity - A Teacher's Guide with Activities in Science, Mathematics, and Technology. National Aeronautics and Space Administration. Disponível em: <<http://teacherlink.ed.usu.edu/tlnasa/units/>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

RUYTERS, G.; FRIEDRICH, U. 2006. From the Bremen Drop Tower to the international space station ISS – Ways to weightlessness in the German space life sciences program. **Signal Transduction**, 6: 397–405.

SACK, F.D. 1991. Plant gravity sensing. **International review cytology**, 127: 193-252.

SCANDALIOS, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 38: 995-1014.

SHANKER, A.K.; PATHMANABHAN, G. 2004. Speciation dependant antioxidative response in roots and leaves of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv CO 27) under Cr(III) and Cr(VI) stress. **Plant and Soil**, 265: 141–151.

SILVA, M.A.; SILVA J.A.G.; ENCISO J.; SHARMA V.; JIFON, J. 2008. Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. **Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)**, 65: 620-627.

SINCLAIR, W.; OLIVER, I.; MAHER, P.; TREWAVAS, A.J. 1996. The role of calmodulin in the gravitropic response of the Arabidopsis thaliana agr-3 mutant. **Planta**, 99: 343–351.

SINGH, N.; MA, L.Q.; SRIVASTAVA, M.; RATHINASABAPATHI, B. 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. **Plant Science**, 170: 274-282.

SIYIANNIS, V.F.; PROTONOTARIOS, V.E.; ZECHMANN, B.; CHORIANOPOULOU, S.N.; MÜLLER, M.; HAWKESFORD, M.J.; BOURANIS, D.L. 2012. Comparative spatiotemporal analysis of root aerenchyma formation processes in maize due to sulphate, nitrate or phosphate deprivation. **Protoplasma**, 249: 671–686.

SMIT, M.A.; SINGELS, A. 2006. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, 98: 91-97.

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

SOUZA, R.P.; MACHADO, E.C.; SILVEIRA, J.A.G.; RIBEIRO, R.V. 2011. Fotossíntese e acúmulo de solutos em feijoeiro caupi submetido à salinidade. **Pesq. agropec. bras.**, 46: 586-592.

STRAND, A.; HURRY, V.; GUSTAFSSON, P.; GARDESTROM, P. 1997. Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. **The Plant Journal**, 12(3): 605-614.

STREB, S.; ZEEMAN, S.C. 2012. Starch Metabolism in Arabidopsis. **The Arabidopsis Book**, 10: 2-33.

SUN, F.; ZHANG, W.; HU, H.; LI, B.; WANG, Y.; ZHAO, Y.; LI, K.; LI, X. 2008. Salt modulates gravity signaling pathway to regulate growth direction of primary roots in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 146(1): 178–188.

TOYOTA, M.; FURUICHI, T.; TATSUMI, H.; SOKABE, M. 2008. Cytoplasmic Calcium Increases in Response to Changes in the Gravity Vector in Hypocotyls and Petioles of Arabidopsis Seedlings. **Plant Physiology**, 146: 504-514.

VASSEY, T.L.; SHARKEY, T.D. 1989. Mild Water Stress of Phaseolus vulgaris Plants Leads to Reduced Starch Synthesis and Extractable Sucrose Phosphate Synthase Activity. **Plant Physiol.**, 89: 1066-1070.

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 Biotechnology Journal**, 8: 263-276.

WASTENEYS, G.O. 2003. Microtubules show their sensitive nature. **Plant cell physiology**, 44: 653-654.

YANG, X.; LI, Y.; REN, B.; DING, L.; GAO, C.; SHEN, Q.; GUO, S. 2012. Drought-Induced Root Aerenchyma Formation Restricts Water Uptake in Rice Seedlings Supplied with Nitrate. **Plant Cell Physiol.**, 53(3): 495–504

YOUNG, L.M.; EVANS, M.L. 1994. Calcium-dependent asymmetric movement of 3H-indole-3-acetic acid across gravistimulated isolated root caps of maize. **Plant Growth Regul.**, 14: 235–240.

ZEEMAN, S.C.; SMITH, S.M.; SMITH, A.M. 2004a. The breakdown of starch in leaves. **New Phytologist**, 163: 247–261.

ZEEMAN, S. C.; THORNEYCROFT, D.; SCHUPP, N.; CHAPPLE, A.; WECK, M.; DUNSTAN, H.; HALDIMANN, PIERRE.; BECHTOLD, N.; SMITH, A. M.; AND SMITH, S. M. 2004b. Plastidial α -Glucan Phosphorylase Is Not Required for Starch Degradation in Arabidopsis Leaves But Has a Role in the Tolerance of Abiotic Stress. **Plant Physiology**, 135: 849–858.

ZEEMAN, S.C.; SMITH, S.M.; SMITH, A.M. 2007. The diurnal metabolism of leaf starch. **Biochem. J.**, 401: 13-28.

ZHANG, J.; CHIODINI, R.; BADR, A.; ZHANG, G. 2011. The impact of next-generation sequencing on genomics. **Journal of Genetics and Genomics**, 38: 95-109.

ZHANG, S.H.; YANG, Q.; MA, R.C. 2007. *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* Infection Induced “Defense Lignin” Accumulation and Lignin Biosynthetic Gene Expression in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). **Journal of Integrative Plant Biology**, 49(7): 993–1002.

ZHOU B, GUO Z, LIU Z. 2005. Effects of abscisic acid on antioxidant systems of *Stylosanthes guianensis* (Aublet) Sw. under chilling stress. **Crop Science**, 45: 599–605.

ZUPANSKA A. K., DENISON, F. C.; FERL, R. J.; PAUL, A. 2012. Spaceflight engages heat shock protein and other molecular chaperone genes in *Arabidopsis* tissue culture cells. **American Journal of Botany** , 100: 235–248.