

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM
CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO ATAQUE DE
CIGARRINHA-DAS-RAÍZES**

Lúcia Lopes

Bióloga

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM
CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO ATAQUE DE
CIGARRINHA-DAS-RAÍZES**

Lúcia Lopes

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

2013

L864e Lopes, Lúcia
Expressão gênica diferencial em cana-de-açúcar em resposta ao ataque de cigarrinha-das-raízes / Lúcia Lopes. -- Jaboticabal, 2013 iv, 48f. : il. ; 28cm

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro
Banca Examinadora: Flávia Maria de Souza Carvalho, Samira Domingues Carlin Cavallari
Bibliografia

1. Estresse biótico. 2. Saccharum spp. 3. cDNA-AFLP. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61:632.9

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Lúcia Lopes – nasceu em 9 de dezembro de 1985, em Ribeirão Preto, estado de São Paulo, filha de Maria de Lourdes Balduino Lopes e Antonio Bernardo Lopes. Ingressou, em 2006, no curso de Ciências Biológicas, na Universidade Estadual Paulista. Durante o período de graduação, estagiou por 9 meses na área de Morfologia Vegetal, e posteriormente por 3 anos na área de genética e biologia molecular de microorganismos, sendo por 2 anos, bolsista de iniciação científica PIBIC; foi monitora de imunologia, com bolsa de apoio acadêmico e ministrou aulas como voluntária no “Cursinho Ativo” pré-vestibular. Formou-se bacharel em Ciências Biológicas pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal em 2010 e posteriormente foi bolsista FAPESP de treinamento técnico junto ao Centro de Pesquisa em Virologia, na USP – Ribeirão Preto - SP. Em agosto de 2011 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticabal) com financiamento pela CAPES. Nesse período participou de reuniões científicas e recebeu Menção Honrosa com a apresentação do trabalho intitulado “Identification of genes differentially expressed in roots of sugarcane attacked by leafhopper-of-root from the cDNA-AFLP technique” pelo 58º Congresso Brasileiro de Genética.

Transição

Fernando Anitelli

Apreciar os riscos e suposições
Manifestar brandura e mansidão
Assegurar acessibilidade
E preservar coragem em transição

Se enunciar... repleta e intacta!
Apta a habitar todo lugar!
Se aflorar... bela!

Assim que for embora
Perpetuar a história
Desvalidar o improvável!
Desdenhar do inconcebível!

Ocupar o ar das horas!
Plenas, serenas, inéditas e autênticas!
Revidar!
Bela!

Desperta em nós
nova aurora ao coração!
E ensina a perder... medo!
Alcança a voz!
Acordar de prontidão!
Anunciar!

"Milagres acontecem quando a gente vai à luta!"

DEDICATÓRIA

Aos meus amados **pais, Maria e Antonio**, que nunca mediram esforços para nos dar o melhor em tudo, por toda a educação e o amor maior do mundo! Vocês são os meus amores, meus exemplos de vida, meu espelho, minha inspiração!

Aos meus **irmãos, Líncon e Luís**

Meu eterno agradecimento por toda a dedicação, carinho e respeito! Amo vocês!!!

Ao meu amado **noivo, Gabriel**,

Agradeço por toda a cumplicidade e pelo imenso amor em todas as horas, essa união nos torna ainda mais fortes, por todas as nossas conquistas ao longo da nossa bela caminhada!

A vocês, devo o que sou! Sou feliz por ter o dom da vida ao lado de vocês!!!

Dedico com amor

Aos meus mestres,

Minha homenagem

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus e à bela vida, que amo profundamente, pela maravilhosa oportunidade de aprender a cada dia.
- À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Maria Inês T. Ferro, o meu mais profundo agradecimento pela amizade, por ter me aberto as portas do LBM e por contribuir sempre e incansavelmente para o meu crescimento pessoal e científico. Você é um exemplo de profissional! Sou eternamente grata a você.
- Ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, por todas as prontas sugestões e colaboração, muito obrigada.
- Ao Professor Dr. José Roberto Postali Parra, do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior “Luiz de Queiroz” (ESALQ) - Universidade de São Paulo (USP), por possibilitar o uso de seu laboratório e equipamentos, que possibilitaram a infestação dos cultivares por ninfas de cigarrinha-das-raízes.
- À Me. Eliane Grisoto, pela indispensável colaboração na infestação dos cultivares por cigarrinha-das-raízes.
- Aos funcionários do Depto. de Tecnologia, por toda a atenção e dedicação: especialmente: Andréia, Renata de Paula, Bethy e João Carlos, bem como a todos os funcionários da UNESP do Campus de Jaboticabal.
- Aos funcionários do CREBIO, queridas Agda, Mariza e Renata, pela imensa colaboração durante o sequenciamento e também nas análises de bioinformática.
- À UNESP/Jaboticabal, pela minha formação acadêmica;
- Ao coordenador, Prof. Dr. Rinaldo Cesar de Paula e também a todos os professores do Programa de Pós-Graduação (Genética e Melhoramento de Plantas) pela orientação e contribuições positivas.
- Às doutoras integrantes da banca do exame de qualificação, Prof^ª. Dr^ª. Maria Inês Tiraboschi Ferro, Prof^ª. Dr^ª. Luciana Rossini Pinto, Dr^ª. Flávia Maria de Souza Carvalho, por todas as sugestões que enriqueceram a esse trabalho.
- ÀS doutoras componentes da comissão examinadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Inês T. Ferro, Dr^ª. Samira Domingues Carlin Cavallari, Dr^ª. Flávia Maria de Souza Carvalho pela disponibilidade em participar da banca de dissertação de mestrado, dando importante colaboração para a conclusão desse trabalho.

- A todos os estudantes do Departamento de Tecnologia.
- À “família LBM”!!! Obrigada por esse tempo de convivência, por toda a paciência e opiniões, sem as quais não seria possível realizar esse trabalho. Agradeço profundamente a todos os colegas do LBM.
- Às amigas e companheiras de trabalho: Renata, pela incansável ajuda e preciosa atenção, não só nas análises de bioinformática, mas na vida... Uma amiga sempre disposta a ouvir e aconselhar (e que faz lanchinhos incríveis)! À cara Aline, pela parceria e companheirismo nos experimentos; à Ana, por sua doce amizade e imensa colaboração no preparo das células competentes utilizadas nesse trabalho; à querida Juliana Vantini, pela amizade e pelo fundamental auxílio nesse experimento, tanto nas primeiras extrações de RNA, como também na confecção do gel de poliacrilamida.
- Ao meu lindo noivo, Gabriel, por todo o amor e atenção, pela intensa motivação o tempo todo.
- Aos meus sobrinhos, Heitor e Luísa que me fazem sorrir e me ensinam muito! Amo vocês, meus pequeninos.
- À minha mãe, Maria de Lourdes Balduino Lopes, por toda a doçura e coragem, por ser, a todo instante, um exemplo de bondade e me ensinando sempre que o amor é capaz de transformar.
- Ao meu pai, Antonio Bernardo Lopes, um exemplo de força e de persistência. Mostrando que é possível ter garra e vencer com coragem e amor.
- À minha querida família.
- Aos cidadãos brasileiros que sustentam a nossa universidade pública.
- À CAPES e FAPESP, pelo financiamento.

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Aspectos gerais da cana-de-açúcar	3
2.1.1 Importância econômica	3
2.1.2 Sistema radicular	4
2.1.3 Métodos de colheita.....	4
2.2 Cigarrinha-das-raízes	5
2.3 Resistência da planta à praga	5
2.4 Não-preferência, antibiose e tolerância	6
2.5 Técnica de cDNA-AFLP	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Material vegetal	9
3.2 Infestação por ninfas de cigarrinha-das-raízes.....	10
3.3 Coleta das raízes de cana-de-açúcar	10
3.4 Extração de RNA	11
3.5 Quantificação do RNA total	12
3.6 Análise da integridade do RNA total.....	12
3.7 Síntese do DNA complementar de dupla-fita.....	13
3.7.1 Síntese da 1ª fita de cDNA	13
3.7.2 Síntese da 2ª fita de cDNAs.....	13
3.7.3 Purificação do cDNA de dupla-fita pelo Método Fenol-Clorofórmio	14
3.8 A técnica de cDNA-AFLP	14
3.8.1 Reação de Restrição	15
3.8.2 Reação de Ligação dos adaptadores	15
3.8.3 Reação de amplificação pré-seletiva	15
3.8.4 Reação de Amplificação Seletiva.....	16
3.8.5 Eletroforese Vertical com Gel de Poliacrilamida 6%.....	17

3.9	Detecção, Recuperação e Reamplificação dos FDE.....	20
3.10	Purificação dos FDE	21
3.11	Clonagem dos FDE	22
3.12	Preparação do DNA Plasmidial	23
3.13	Sequenciamento dos FDE	25
3.14	Análise dos FDE	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5	CONCLUSÕES.....	41
6	REFERÊNCIAS	42
7	IMPLICAÇÕES	48

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO ATAQUE DE CIGARRINHA-DAS- RAÍZES

RESUMO – Atualmente, a cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) tem sido ameaçada pela infestação por cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*) e a preocupação com efeitos danosos por ela ocasionados são crescentes, especialmente em função do aumento de condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dessa praga, devido ao sistema de colheita em expansão, em que não há a queima da palhada. A fim de identificar Fragmentos Diferencialmente Expressos (FDE) em raízes de cana-de-açúcar infestadas por ninfas de cigarrinha, foi realizada a técnica de cDNA-AFLP. Assim, foram cultivadas e posteriormente infestadas, plantas de uma variedade suscetível (SP80-1816) e de uma variedade resistente (“menos infestada”) (SP83-5073). As amostras das raízes foram coletadas e congeladas a cada 1, 2, 7 e 14 dias de infestação. A posterior análise através da técnica de cDNA-AFLP, a partir de 3 combinações de oligonucleotídeos, permitiu observar 21 FDE, os quais foram sequenciados e revelaram similaridades com proteínas envolvidas em diferentes atividades, como a transposição de DNA, o transporte de aminoácidos e a transcrição gênica, além de outras proteínas sem similaridade encontrada. Os alinhamentos apresentaram similaridades para os genes expressos e é possível considerar que o caráter de resistência esteja relacionado a uma ação conjunta de diversos genes, além disso, alguns dos FDE obtidos não apresentam similaridades e podem exercer importante papel no mecanismo de resistência.

Palavras-chave: *Saccharum spp.*, *Mahanarva fimbriolata*, cDNA-AFLP, infestação, raízes.

DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN SUGARCANE IN RESPONSE TO ATTACK BY ROOT FROGHOPPER

ABSTRACT – Currently, the sugarcane (*Saccharum* spp.) has been threatened by the infestation of frog hopper (*Mahanarva fimbriolata*) and the concern about the harmful effects caused by it are growing, especially due to the increase of environmental conditions favorable the development of this pest, due to the expanding harvest system, in which there is no burning of stubble. In order to identify Differential Fragments Expression (FDE) in roots of sugarcane infested by frog hopper nymphs was performed cDNA-AFLP technique. Thus, were grown and subsequently infested plants of a susceptible variety (SP80-1816) and a resistant variety ("least infested") (SP83-5073). Samples of roots were collected and frozen every 1, 2, 7 and 14 days of infestation. The subsequent analysis by cDNA-AFLP technique from three combinations of primers allowed the observation FDE 21 which were sequenced and revealed similarities to proteins involved in various activities, such as transposition of DNA, amino acid transport and gene transcription, in addition to other proteins without similarity found. The alignments showed similarities to genes expressed and it is possible to consider the character of resistance is related to a joint action of several genes, in addition, some of the FDE obtained do not show similarities and may have an important role in the mechanism of resistance.

Keywords: *Saccharum* spp., *Mahanarva fimbriolata*, cDNA-AFLP, infestation, roots.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma gramínea importante economicamente, cuja lavoura encontra-se em expansão no Brasil e tem o estado de São Paulo como o maior produtor em relação à área nacional plantada. Os aspectos econômicos positivos ligados a essa cultura estão relacionados aos diversos produtos e subprodutos que dela provem, tais como o etanol, um combustível limpo e renovável, o açúcar e a cachaça, além da consequente geração de empregos relacionados a esse setor.

Atualmente, a perspectiva de expansão de área no país deve ficar em 676 mil hectares e nesse sentido é prevista uma produção total de açúcar estimada em 38,99 milhões de toneladas e uma produção de etanol de 23,49 bilhões de litros (CONAB, 2012). A colheita da cana pode ser realizada após a sua queima, nesse caso há a liberação de gás carbônico e a queima da matéria orgânica, o que facilita o corte manual, ou pode ser realizado o corte mecanizado, em que não há queima. Esse último modo de colheita, com a cana crua, permite o acúmulo de pedaços de colmo, folhas e ponteiros no ambiente, que compõem a denominada palha ou palhada.

No Estado de São Paulo uma Lei Estadual 11.241/02 regulamentada pelo decreto 47.700/03, impõe que, até o ano de 2021, em 100% das áreas mecanizáveis a cana seja colhida crua, ou seja, sem queima da palha. O ambiente propiciado pelo corte da cana crua, como o aumento da umidade e a estabilidade da temperatura local, favorece o aparecimento de algumas pragas, como a cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*). No estado de São Paulo, essa praga ocorre especialmente nas áreas de colheita mecanizada (DINARDO-MIRANDA, 2006). As cigarrinhas são insetos sugadores de plantas, pertencentes à ordem hemiptera e à família Cercopidae que sugam a seiva das partes aéreas e as raízes das plantas. Esses insetos estão presentes na América tropical e, no Brasil a *M. fimbriolata* tem se tornado cada vez mais importante nas plantações de cana; devido à temperatura favorável e às condições propiciadas pelo acúmulo da palhada após a colheita sem a queima prévia (GARCIA et al., 2006). Atualmente, a maioria das variedades cultivadas é suscetível à praga, causando reduções de produtividade em

decorrência do ataque (MACEDO et al., 2006) e para que seu controle seja efetuado, podem ser recomendadas medidas de controle químico, cultural e biológico. As fêmeas de *M. fimbriolata*, ovipositam na camada de palha, próxima aos colmos e as ninfas eclodem dos ovos e buscam raízes jovens pra se alimentarem da seiva do xilema (GUIMARÃES, 2007).

Uma característica das ninfas da família cercopidae é a produção de uma espuma que as protege da desidratação. No que diz respeito às consequências do ataque da cigarrinha-das-raízes, as ninfas causam uma desordem fisiológica na planta, uma vez que as picadas atingem os elementos traqueais da raiz e os deterioram, dificultando ou impedindo o fluxo de água e de nutrientes (GARCIA et al., 2007). Apesar da redução na produtividade e na qualidade da cana em virtude do ataque de cigarrinhas, poucas pesquisas têm focado a relação entre essa praga com a cana-de-açúcar e dessa forma, pouca informação no tocante à resistência de variedades de cana-de-açúcar às cigarrinhas está disponível, especialmente relacionada à expressão gênica diferencial.

A técnica de cDNA-AFLP foi utilizada nesse trabalho a fim de possibilitar a obtenção de fragmentos diferencialmente expressos na variedade resistente em detrimento à suscetível. Essa técnica se baseia na técnica de AFLP, descrita por Vos et al. (1995), contudo, utiliza-se o cDNA em vez de DNA genômico e tem sido utilizada na discriminação de genes diferencialmente expressos em plantas (LESTARI et al., 2006), pois se trata de uma técnica, sensível e reprodutível para a detecção dos genes (BACHEM et al. 1998). São algumas vantagens dessa técnica o uso de pequenas quantidades de cDNAs e o fato de que não é necessário nenhum conhecimento anterior sobre as sequências que se deseja estudar.

Nesse trabalho foi realizada uma abordagem molecular fazendo uso da técnica de cDNA-AFLP, com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos em raízes de cana-de-açúcar infestadas por ninfas de *M. fimbriolata* e analisar as similaridades de sequências a esses fragmentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Essa revisão apresenta os principais aspectos relacionados à cultura da cana-de-açúcar, incluindo a importância econômica e as novas determinações para o cultivo. Além disso, são apresentadas as principais informações sobre a biologia da cigarrinha-das-raízes e os danos ocasionados por ela à cana-de-açúcar.

2.1 Aspectos gerais da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea (*Poaceae*) do gênero *Saccharum L.*, cultivada nas regiões tropicais e subtropicais. Existem pelo menos seis espécies do gênero, sendo a cana-de-açúcar cultivada, um híbrido multiespecífico e recebe a designação *Saccharum spp* (TOPPA et al., 2010). Sua provável origem é o sudeste asiático, na região da Nova Guiné e Indonésia, e tem sido cultivada a mais de 4000 anos (BORRÁS – HIDALGO et al., 2005).

2.1.1 Importância econômica

Atualmente o Brasil é o maior produtor de cana do mundo, além de ser o maior produtor de açúcar e etanol e conquistar o mercado interno com o uso do biocombustível (MAPA, 2012). Segundo a Conab (2012), a lavoura de cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil e as áreas em produção continuam com um progressivo aumento nos Estados de: Mato Grosso do Sul 12,5%, Goiás 7,9%, Espírito Santo 7,35%, Bahia 5,3%, Mato Grosso 5,5%, e Minas Gerais (3,5%).

A cana-de-açúcar assume elevada importância econômica, especialmente em função dos vários produtos aos quais pode dar origem, podendo ser utilizada na produção do açúcar, etanol, cachaça, rapadura, entre outros. Apresenta ainda, resíduos que são interessantes economicamente, como o vinhoto e o bagaço, que podem ser utilizados na obtenção do adubo e combustível, respectivamente (CAPUTO et al., 2008), e nesse contexto envolve-se toda a mão de obra relacionada.

As fontes de energia obtidas a partir da cana-de-açúcar também vão ao encontro das preocupações relacionadas ao uso de combustíveis fósseis, em detrimento às fontes renováveis de energia, uma vez que a cana-de-açúcar é uma

das melhores opções dentre as fontes de energia renováveis no cenário agrícola brasileiro e também mundial (MAULE et al., 2001).

2.1.2 Sistema radicular

As plantas de diferentes espécies apresentam diferenças quanto aos seus sistemas radiculares, segundo Vasconcelos (1999) citado por Vasconcelos e Dinardo-Miranda (2010), entre variedades de cana-de-açúcar, características genéticas determinam diferenças quanto ao desenvolvimento e arquitetura do seu sistema radicular. O mesmo autor afirma que existem variedades com maior concentração de raízes na superfície em comparação com outras, que tem distribuição mais uniforme em profundidade.

A adaptação para as condições ambientais pode diferir de uma variedade a outra, de modo que há interação entre o sistema radicular e o solo. O ataque das raízes novas por pragas ou nematóides causa um atraso ou uma interrupção do processo de enraizamento, que pode comprometer o estabelecimento e todo o histórico de produtividade da cultura (VASCONCELOS E DINARDO-MIRANDA, 2010). Segundo Guimarães (2007), é possível que a morfologia das raízes tenha influência na reação das variedades de cana-de-açúcar à cigarrinha-das-raízes.

2.1.3 Métodos de colheita

Os diferentes procedimentos para a colheita da cana-de-açúcar podem influenciar de forma direta o desenvolvimento dessa cultura, sendo que os métodos utilizados atualmente incluem o corte manual, que requer mão de obra numerosa e necessita da queima da palhada, ou mecanicamente, em que não há a queima.

A colheita mecanizada, em que não ocorre a queima prévia, é interessante do ponto de vista ambiental em razão da redução da emissão de CO₂ e se tornará obrigatória no estado de São Paulo, uma vez que, uma lei estadual - Lei Estadual 11.241/02 regulamentada pelo decreto 47.700/03 – (SÃO PAULO, 2002) impõe que, até o ano de 2021, em 100% das áreas mecanizáveis a cana seja colhida sem a queima da palhada.

Dessa forma, um novo ambiente se forma com o acúmulo da matéria orgânica, à medida que não ocorre a queima da cana-de-açúcar, influenciando a

ocorrência de pragas e doenças (ALMEIDA et al., 2003), incluindo a cigarrinha-das-raízes.

2.2 Cigarrinha-das-raízes

A cigarrinha-das-raízes, *M. fimbriolata* é uma das pragas da cana-de-açúcar e foi descrita inicialmente por Stål (1854) (Hemiptera: Cercopidae). Existem ainda, outras espécies de cigarrinha no Brasil (VALÉRIO & KOLLER, 1993), tais como a cigarrinha-da-folha (*M. posticata*) e a cigarrinha-do-cartucho (*M. rubicunda indentata*) (RAVANELI, 2010).

Segundo Mendonça et al. (1996) citado por Guimarães (2007), os hospedeiros naturais da cigarrinha-das-raízes são especialmente gramíneas nativas da região norte do Brasil e as do gênero *Brachiaria*, sendo que a cana assume o papel de hospedeiro alternativo.

Com a eliminação da queima antes da colheita, a importância dessa praga vem aumentando no Estado de São Paulo, principalmente em locais de temperatura elevada (DINARDO-MIRANDA et al., 2001). Devido ao ambiente propício, as fêmeas ovipositam na camada de palha e à medida que as ninfas eclodem dos ovos, buscam as raízes e se alimentam do xilema (GUIMARÃES, 2007). A alimentação das ninfas dificulta o fluxo de água e nutrientes na planta, o que provoca uma desordem fisiológica (GARCIA et al., 2007), uma vez em deficiência hídrica a fotossíntese é reduzida, o que pode comprometer o desenvolvimento da planta.

2.3 Resistência da planta à praga

Segundo Painter (1951) citado por Lara (1991), a resistência de plantas a insetos é uma soma de qualidades hereditárias que influenciam o grau do dano causado pelo inseto. Sendo, dessa forma, um caráter relativo, ou seja, comparativo de duas ou mais plantas, de acordo com o dano sofrido pela planta (LARA, 1991).

Os genótipos utilizados nesse trabalho são descritos na literatura como distintos em relação ao ataque por cigarrinha-das-raízes e, levando em consideração o caráter comparativo, já apresentado, para a denominação de “resistência” e “susceptibilidade”, a variedade SP80-1816 (suscetível, DINARDO-

MIRANDA, 2004) foi considerada suscetível em relação à SP83-5073 (menos-infestada, DINARDO-MIRANDA, 2003).

O resultado obtido por Guimarães (2007) vai ao encontro do conceito adotado, uma vez que foi observada uma tendência de diminuição da altura e diâmetro em colmos das variedades SP80-1816 e RB72454 ao longo do tempo, em oposição ao observado na SP83-5073, quando todas essas variedades foram igualmente infestadas por cigarrinha-das-raízes.

A resistência das plantas a insetos pode ser classificada em três tipos, de acordo com os mecanismos por meio dos quais a planta interfere no comportamento do inseto, são eles: a não-preferência, a antibiose e a tolerância (LARA, 1991).

2.4 Não-preferência, antibiose e tolerância

A resistência do tipo “não-preferência” afeta o comportamento do inseto, de modo que nessa condição a planta é menos utilizada para a alimentação, oviposição ou abrigo. SILVA et al. (2005) sugeriram que níveis mais elevados de fenóis estejam envolvidos com a não-preferência da cigarrinha-das-raízes pela variedade SP86-42 em comparação à SP80-1816, em um mesmo nível de infestação.

Nesse contexto, Guimarães (2007) observou maiores níveis constitutivos desses compostos na variedade SP83-5073 em comparação com as variedades SP80-1816 e RB72454; a comparação entre as duas últimas variedades citadas também foi realizada por Dinardo-Miranda (2004), mas em condições de campo e nesse estudo a variedade RB72454 apresentou menor infestação, quando comparada a SP80-1816.

Em contrapartida, na resistência do tipo “antibiose”, o inseto chega a se alimentar da planta, mas essa afeta de alguma forma a sua biologia, o que pode ocorrer com relação à reprodução, causar mortalidade, reduzir o tamanho ou o peso, reduzir a fecundidade, alterar a proporção sexual ou alterar o tempo de vida (LARA, 1991). Grisoto (2008) estudou a biologia da cigarrinha-das-raízes em sete Gramineae em laboratório, foram elas: cana-de-açúcar cv. SP-80 1842 – testemunha, *Setaria anceps* cv. Kazungula, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, ecótipos BB 33 e BB 39, e seleções IAC-BBS 5 e IAC-BBS 8, a fim de avaliar a resistência a essa praga. Esse estudo apresentou a resistência do tipo antibiose

para a seleção IAC-BBS 8 e para *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, sendo os demais suscetíveis à praga.

Outro tipo de resistência é a “tolerância”, a planta sofre um dano menor em relação a outras, quando em condições experimentais todas são submetidas a um mesmo nível de infestação, mas o seu comportamento ou biologia não são afetados (LARA, 1991). Não foi encontrado na literatura um estudo específico de resistência do tipo “tolerância” para plantas infestadas por cigarrinha-das-raízes, todavia, outras espécies são descritas como tolerantes. De acordo com Townsend et al.,(2001), na década de 80, as pastagens cultivadas no Estado de Rondônia eram formadas principalmente pelas gramíneas *Brachiaria decumbens*, *B. ruzizensis* e *B. humidicola*, sendo as duas primeiras altamente susceptíveis ao ataque de cigarrinhas-das-pastagens e a última, resistente através do mecanismo de tolerância, o que tornava a pecuária estadual bastante vulnerável à praga. Valério & Koller (1993) confirmam o caráter de tolerância de *Brachiaria humidicola* e a possibilidade de que essa condição favoreça a multiplicação da praga. Há pouca informação com relação à resistência das variedades de cana-de-açúcar ao ataque por cigarrinha-das-raízes, principalmente quanto à expressão gênica e, nesse sentido, a técnica de cDNA-AFLP foi importante para a realização de uma abordagem molecular de investigação de genes diferencialmente expressos na variedade resistente infestada.

2.5 Técnica de cDNA-AFLP

Atualmente existem muitas metodologias que permitem a análises dos transcritos, como os arranjos de cDNA, northern blot, qPCR, etc; entretanto a técnica de cDNA-AFLP é interessante, uma vez que para a sua realização não são necessárias grandes quantidades de cDNA e não requer um conhecimento anterior sobre as sequencias que se deseja estudar (APPLIED BIOSYSTEMS-PE, 1997). Essa técnica permite a comparação de qualquer quantidade de amostras e menos de 5 ug de RNA são necessários para até 240 reações (GUIMARÃES, 2007), ela foi baseada na técnica de AFLP descrita por Vos et al., (1995) todavia, para sua realização é utilizado cDNA em vez de DNA. Tal técnica tem sido utilizada para o estudo da expressão gênica diferencial em larga escala em plantas (LESTARI et al.,

2006) e pode ser utilizada na investigação de uma grande variedade de tipos de tecidos, fases de desenvolvimento e intervalos de tempo, que podem ser comparados simultaneamente (ALBA, et al., 2004).

As etapas para essa técnica, segundo Bachem et al. (1998), compreendem (**Figura 1**): a síntese do cDNA a partir do RNA mensageiro; a clivagem dos cDNAs com enzimas de restrição e a ligação de adaptadores às extremidades dos fragmentos gerados; a realização da amplificação pré-seletiva a partir do uso do par de oligonucleotídeos, com um nucleotídeo seletivo adicional à porção 3' (oligonucleotídeo EcoR I com uma adenina e oligonucleotídeo Mse I contendo uma citosina), e por fim, a amplificação seletiva por meio dos oligonucleotídeos seletivos, contendo dois nucleotídeos seletivos adicionais.

Os fragmentos gerados a partir de duas enzimas, uma de corte raro e uma de corte frequente, permitem a detecção de diferentes padrões de expressão, de acordo com as combinações de oligonucleotídeos que se ligam à sequência dos adaptadores e sítio de restrição adjacente.

Segundo Bleas et al. (1998) são exemplos de enzimas utilizadas no AFLP, as de corte raro: EcoRI, AseI, HindIII, ApaI e PstI e as de corte frequente: MseI e TaqI. Entretanto o DNA da maioria dos eucariotos é rico em "AT", e para a técnica de AFLP é preferencial o uso da enzima MseI, por possuir a sequência de reconhecimento "TTAA", produzindo fragmentos no tamanho ideal para as amplificações por PCR e separação após a desnaturação, no gel de poliacrilamida (VOS et al., 1995).

A identificação de FDE é possível pela visualização das bandas em gel de poliacrilamida 6% após a eletroforese e coloração com nitrato de prata, situação em que a expressão diferencial pode ser notada quanto à intensidade, presença e ausência das bandas nas diferentes variedades e tratamentos.

De acordo com Blears et al.(1998), essa técnica é vantajosa, uma vez que torna possível a eventual recuperação de fragmentos a partir do gel seco, bastando para isso realizar a reidratação e transferência para a amplificação por PCR. Ademais, esta técnica pode ser útil a diversos estudos, como por exemplo, quando se deseja visualizar transcritos altamente homólogos, em sistemas onde pequenas diferenças na expressão são esperadas ou no isolamento de genes relacionados a processos específicos, além de poder ser utilizada como ferramenta em diagnósticos (BACHEM et al.,1998).

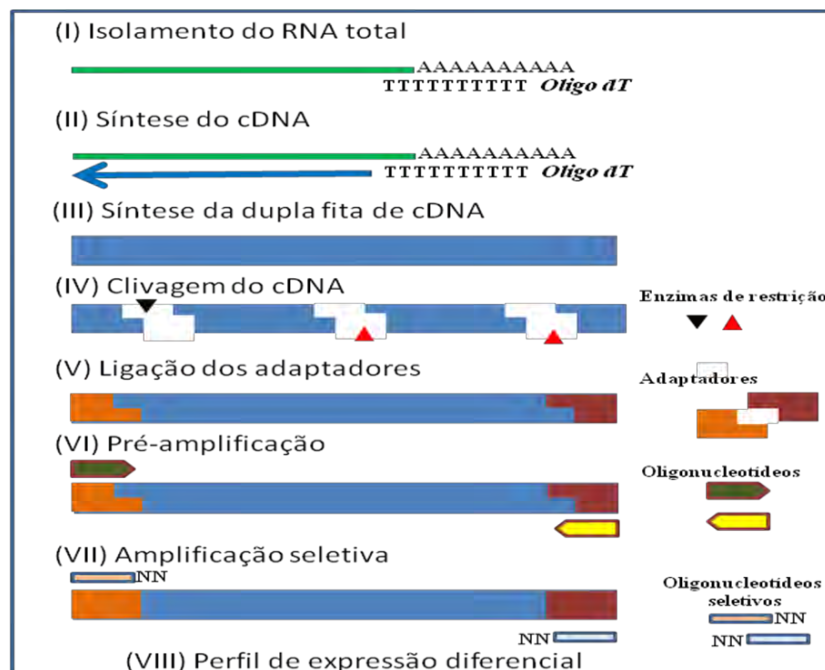


Figura1. Esquema da metodologia de cDNA-AFLP. Baseado na figura de BACHEM *et Al.*, 1998.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para a constituição do material vegetal utilizado, foram plantados minitoletes das variedades SP80-1816 (suscetível, SILVA et al., 2005; DINARDO-MIRANDA, 2004) e SP83-5073, (resistente, “menos infestada”, DINARDO-MIRANDA, 2003) em copos plásticos descartáveis de 300 mL contendo um substrato à base de vermiculita (Plantmax HT ®, Eucatex). Esses foram irrigados diariamente até a

capacidade de campo. Dessa forma, o experimento foi conduzido com 2 variedades, sendo utilizadas 4 plantas para cada variedade, e seus respectivos controles (4 plantas) para cada um dos 4 dias de infestação - [2 X (4 plantas para a infestação + 4 plantas-controle) X 4] – totalizando 64 plantas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação desde o plantio e no 97º dia foram encaminhadas para a ESALQ - USP, na cidade de Piracicaba – SP, para aclimação por 3 dias em salas com temperatura de 25+/- 1 °C, umidade relativa de 70% +/- 10% e fotofase de 14 horas.

3.2 Infestação por ninfas de cigarrinha-das-raízes

A criação das ninfas de cigarrinha-das-raízes foi realizada de acordo com Garcia et al. (2006) e ocorreu no laboratório de Resistência de Plantas a Insetos, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba - SP. Para a infestação das variedades de cana-de-açúcar, que ocorreu aos 100 dias após o plantio, foram utilizadas ninfas em terceiro instar, posteriormente transferidas com auxílio de um pincel, utilizando dez ninfas por planta. A espuma produzida pelas ninfas foi transferida junto delas, a fim de preservar a sobrevivência após a infestação, evitando a desidratação..

Segundo Dinardo-Miranda (2004), o dano mais importante causado pela referida praga é provocado por suas ninfas e, dessa forma, a presença de adultos foi monitorada diariamente e os indivíduos encontrados foram eliminados, de modo que o efeito dos adultos não foi estudado nesse trabalho.

3.3 Coleta das raízes de cana-de-açúcar

As amostras das raízes (infestadas e controles), de ambas as variedades foram coletadas a cada 1, 2, 7 e 14 dias após a infestação. Todo o ambiente e materiais utilizados no processamento das amostras estavam devidamente esterilizados e livres de RNAses, além disso eles foram individualizados para cada variedade. As amostras foram lavadas em água, cortadas com estiletes, envoltas em papel alumínio, identificadas individualmente e armazenadas em nitrogênio líquido para o transporte, após o qual, foram finalmente armazenadas em freezer - 80°C.

3.4 Extração de RNA

Alguns cuidados antecederam a extração do RNA total, os utensílios (almofariz, pistilo e espátulas) foram mantidos a 180°C por 8 h, impedindo assim, a ação de RNases sobre o material em estudo. A extração do RNA total foi realizada a partir de 0,6 g de amostra de raízes, proveniente de alíquotas de mesma massa, advindas das quatro repetições amostrais, utilizando-se o conjunto de reagentes “Illustra RNAspin Mini RNA isolation” (Lote:GE Healthcare). São listados abaixo os passos realizados a partir das instruções do fabricante.

- ❖ **Homogeneização da Amostra:** Cada amostra de 0,6 g foi macerada em nitrogênio líquido com o auxílio de um gral e um pistilo. Essa massa de material utilizada na extração de RNA foi padronizada após alguns ensaios, até que fosse possível a obtenção de uma concentração adequada de RNA ;
- ❖ **Lise Celular:** Foram adicionados 350 µL do tampão RA1 (a partir do conjunto de reagentes) e 3,5 µL de β-mercaptoetanol, essa mistura foi homogeneizada com o auxílio do vórtex;
- ❖ **Filtração dos Resíduos Celulares:** O produto da reação de lise foi aplicado em um minifiltro RNAspin inserido em tubo coletor e a filtração ocorreu por meio de centrifugação por (1 minuto à 11.000 X g). O filtrado resultante foi transferido para outro tubo de microcentrifuga de 1,5 mL;
- ❖ **Ajuste das Condições para a Ligação do RNA:** Foram adicionados 350 µL de etanol 70% ao filtrado e realizada a mistura por 5 segundos, em vórtex (duas vezes);
- ❖ **Ligação do RNA:** Cada lisado foi homogeneizado por movimento da ponteira (2 a 3 vezes) e inserido no centro de sua correspondente minicoluna RNAspin (dentro de um tubo de microcentrifuga de 2,0 mL), posteriormente houve a centrifugação por 30 segundos a 8.000 X g;
- ❖ **Dessalinização da Membrana de Sílica:** Adicionou-se 350 µL de tampão de dessalinização da membrana (MDB) e centrifugou-se a 11.000 X g por 1 minuto. O fluido foi descartado e a coluna foi novamente inserida no tubo

coletor. Essa etapa é importante, porque a remoção do sal aumenta a eficiência da lise do DNA por ação da enzima DNase I;

- ❖ **Lise do DNA:** Houve uma preparação prévia do tampão de reação da enzima DNase I. Para cada amostra de extração, adicionou-se 10 µL da DNase para 90 µL do tampão de reação. Foi realizada a mistura por inversão e em seguida aplicou-se 95 µL da mistura da reação contendo a DNase I diretamente no centro da membrana de sílica da coluna. Esse conjunto foi mantido à temperatura ambiente por 15 minutos;
- ❖ **Lavagem e Secagem da Membrana de Sílica:**
 - **Lavagem I** - adicionou-se 200 µL de tampão RA2 (inativador de DNase I) à minicoluna RNAspin e em seguida foi realizada a centrifugação por 1 minuto a 11.000 X g;
 - Lavagem II** - adicionou-se 600 µL do tampão RA3 à minicoluna RNAspin. Centrifugou-se por 1 minuto a 11.000 X g. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e a minicoluna foi colocada no tubo coletor;
 - Lavagem III:** adicionou-se 250 µL do tampão RA3 à minicoluna RNAspin, seguiu-se a centrifugação a 11.000 X g por 2 minutos e a coluna foi inserida em novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL;
- ❖ **Eluição de RNA total de Alta Pureza:** O RNA total obtido foi eluído em 100 µL de água livre de RNases por meio da centrifugação da coluna por 11.000 X g por 1 minuto, em seguida foi estocado ultrafreezer a - 80°C .

3.5 Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA total de todas as amostras foi aferida utilizando-se o equipamento NanoDrop ND-1000 (Uniscience), para isso foram necessários 1,5 µL de cada amostra. A avaliação da pureza das amostras foi baseada nas razões de absorbância 260/280 nm e 260/230 nm, sendo que $A_{260}/A_{280} \text{ nm} \geq 1,80$ e $A_{260}/A_{230} \text{ nm} = 2,00$ são consideradas de boa qualidade. (SAMBROOK et al., 1989).

3.6 Análise da integridade do RNA total

O RNA de todas as amostras teve sua integridade confirmada por meio aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer*, com o uso do Nano Chip (1ul de amostra). Para cada amostra, como o auxílio do programa *2100 Expert Software*, foi calculado o RIN (RNA Integrity Number) indicador da integridade do RNA total.

3.7 Síntese do DNA complementar de dupla-fita

A síntese da primeira fita dos cDNAs das amostras foi realizada a partir de 5,0 µg do RNA total, a partir do conjunto de reagentes Revertaid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis “kit” (Fermentas, Lituânia), a segunda fita foi sintetizada conforme as orientações do mesmo fabricante.

3.7.1 Síntese da 1ª fita de cDNA

Para a síntese da primeira fita foram adicionadas a um tubo de microcentrífuga estéril 5,0 µg do RNA total, com a adição de água DEPC em q.s.p. 11 µL; em seguida foram adicionados, na ordem que se segue: 1,0 µL de oligo(dT); 4,0 µL de tampão 5X de reação; 1µL de RiboLock™ RNase Inhibitor (20U/µL); 2,0 µL de mix de dNTP a 10 mM; e 1 µL da enzima RevertAid™ H Minus M-MuLV Transcriptase Reverse (200U/µL). O tubo foi agitado gentilmente e posteriormente foi rapidamente centrifugado, para a remoção das gotas da tampa. A reação foi mantida por 60 min a 42°C e em seguida foi interrompida por aquecimento a 70°C por 5 minutos.

3.7.2 Síntese da 2ª fita de cDNAs

Foram adicionados aos 20 µL da reação de síntese da primeira fita: 8,0 µL de tampão 10X de reação da DNA Polimerase I (Fermentas, Lituânia); 1,0 U da enzima RNase H, *E. coli* (Invitrogen Corp., CA, USA); 30 U da enzima DNA Polimerase I, *E. coli* (Fermentas, Lituânia); água livre de nucleases em q.s.p. 100 µL; a reação foi mantida a 15°C por 2 horas;

Em seguida foram adicionadas 12,5 U da enzima T4 DNA Polimerase (*Fermentas*, Lituânia) e a reação foi incubada a 15°C por 5 minutos e a reação foi

interrompida por meio da adição de 5,0 μ L de EDTA 0,5 M, pH 8,0. Os cDNAs de dupla-fita foram purificados com o uso de fenol-clorofórmio.

3.7.3 Purificação do cDNA de dupla-fita pelo Método Fenol-Clorofórmio

Os passos para a técnica de purificação do cDNA das amostras pelo Método Fenol-Clorofórmio são apresentados abaixo:

- ❖ **Purificação do cDNA:** Foi adicionada água ultrapura estéril a 100 μ L do cDNA em dupla-fita, em q.s.p. 500 μ L; em seguida adicionou-se 500 μ L da mistura de fenol (pH 8,0), clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, respectivamente, e em seguida o tubo foi agitado gentilmente; centrifugou-se a 2300 X g por 5 minutos; a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, no qual foram adicionados 500 μ L de clorofórmio (puro) e o tubo foi submetido à outra leve agitação e centrifugou-se a 2300 X g por 5 minutos. Os dois últimos passos descritos foram repetidos mais uma vez.
- ❖ **Precipitação do cDNA:** A fase aquosa foi transferida para um tubo de 1,5 mL e a ela foram adicionados 50 μ L de acetato de sódio (3,0M em pH 5,2) e 500 μ L de isopropanol gelado; a reação foi misturada cuidadosamente mantida *overnight* em freezer a - 20°C;
- ❖ **Lavagem do cDNA:** A mistura refrigerada foi centrifugada a 12.000 X g por 40 minutos; em seguida o sobrenadante foi descartado e ao cDNA precipitado foram adicionados 500 μ L de etanol 70% gelado; centrifugou-se a 12.000 X g por 10 minutos. Os dois últimos passos foram repetidos mais uma vez.
- ❖ **Secagem do cDNA:** O precipitado ficou à temperatura ambiente para que o etanol fosse evaporado e posteriormente foi ressuscitado em 25 μ L de água ultrapura autoclavada. Em seguida o cDNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) e posteriormente armazenado em ultrafreezer a - 80°C.

3.8 A técnica de cDNA-AFLP

Para a técnica de cDNA-AFLP foi utilizado o “kit” AFLP® Plant Mapping kit (Regular Plant Genomes) da PE-Applied Biosystems, Inc., CA, USA (1997), de

acordo com as instruções do fabricante, entretanto foram realizadas algumas modificações.

3.8.1 Reação de Restrição

Foi realizada a clivagem do cDNA de todas as amostras por uso das enzimas de restrição, EcoRI (corte raro) e MseI (corte frequente). As extremidades formadas pelos cortes permitiram a ligação dos respectivos adaptadores, EcoRI e MseI. Para a reação de restrição foram utilizados: 300 ng de cDNA dupla-fita; 5,0 U da enzima EcoRI (Fermentas, Lituânia); 0,5 U da enzima MseI (Invitrogen Corp., CA, USA); 1,25 µL de tampão React 1 10X (Invitrogen Corp., CA, USA); e água ultra-pura em q.s.p. 12,5 µL. A reação ocorreu a 37°C por 2 h, sendo em seguida, submetida a 70°C por 15 minutos em termociclador PTC-100TM, Programmable Thermal controller MJ Research.

3.8.2 Reação de Ligação dos adaptadores

A sequencia dos adaptadores é complementar às extremidades geradas pelas enzimas de restrição, com a alteração de um nucleotídeo para impedir a restauração do sítio de restrição (BLEARS et al., 1998). Dessa forma os adaptadores servem como sítios de ligação para os oligonucleotídeos utilizados posteriormente.

A reação de ligação dos adaptadores necessitou de 0,33 µL de cada um dos adaptadores EcoRI e MseI, aquecidos a 95°C por 5 minutos e resfriados a temperatura ambiente por 10 minutos. Cada um desses adaptadores foi adicionado a 3,7 µL de cada amostra de cDNA. Em seguida, adicionou-se 0,5 µL de tampão 10X da enzima T4 DNA ligase e 80 U da enzima T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 20°C por 2 h em termociclador e, posteriormente, o conteúdo foi diluído 3X em tampão TE (10 mM de Tris-HCl e 1,0 mM de EDTA em pH 8,0).

3.8.3 Reação de amplificação pré-seletiva

Na amplificação pré-seletiva do cDNA das amostras, foram utilizados os oligonucleotídeos pré-seletivos EcoRI e MseI. As extremidades dos fragmentos de cDNA com os adaptadores permitiram o anelamento dos oligonucleotídeos EcoRI e

MseI, para a amplificação via PCR. Para a realização dessa reação foram adicionados: 4,0 µL da reação anterior diluída 3X; 1,0 µL do mix contendo os oligonucleotídeos pré-seletivos; e 15 µL do AFLP Amplification Core Mix (composto por tampão, dNTPs, MgCl₂ e a enzima DNA polimerase) proveniente do conjunto de reagentes.

A amplificação ocorreu em termociclador, cuja ciclagem foi:

- ❖ 72°C por 2 minutos (início);
- ❖ 94°C por 20 segundos (desnaturação);
- ❖ 56°C por 30 segundos (anelamento);
- ❖ 72°C por 2 minutos (extensão);
- ❖ 60°C por 30 minutos (término).

Sendo que as etapas de desnaturação, anelamento e extensão ocorreram em 20 ciclos.

3.8.4 Reação de Amplificação Seletiva

Foram utilizadas 3 combinações de pares de oligonucleotídeos EcoRI (GACTGCCTACCAATTCXXX) e MseI (GATGAGTCCTGAGTAAXXX), respectivamente com as terminações: AAC/CAG; AGG/CAT e ACT/CTA.

Para a confecção da reação seletiva foram utilizados 2,0 µL dos produtos da reação obtidos a partir da amplificação pré-seletiva diluída 4X em tampão TE; 1,5 µL de tampão 10X (200 mM de Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM de KCl); 1,2 µL de MgCl₂ a 25 mM; 1,5 µL de dNTPs a 2,5 mM (Invitrogen Corp., CA, USA); 2,0 µL do oligonucleotídeo MseI a 10 µM sem marcação fluorescente (Sigma Life Science); 2,0 µL do oligonucleotídeo EcoRI a 10 µM sem marcação fluorescente (Sigma Life Science); 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas, Lituânia) e água ultra pura estéril para um volume final de 15 µL.

Abaixo segue a ciclagem utilizada compreendendo 40 ciclos, sendo que 10 deles tiveram uma redução gradual da temperatura de anelamento de 66°C para 56°C em 1°C por passo, a 56°C por 30 vezes e finalmente, um passo de 60°C por 30 minutos, os passos são apresentados na tabela que se segue:

Início/ Término	Ciclo			Nº de Ciclos
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	
94°C por 2 min	94°C por 20 s	66°C por 30 s	72°C por 2 min	1
-	94°C por 20 s	65°C por 30 s	72°C por 2 min	1
-	94°C por 20 s	64°C por 30 s	72°C por 2 min	1
-	94°C por 20 s	63°C por 30 s	72°C por 2 min	1
-	94°C por 20 s	62°C por 30 s	72°C por 2 min	1
-	94°C por 20 s	61°C por 30 s	72°C por 2 min	1
-	94°C por 20 s	60°C por 30 s	72°C por 2 min	1
-	94°C por 20 s	59°C por 30 s	72°C por 2 min	1
-	94°C por 20 s	58°C por 30 s	72°C por 2 min	1
-	94°C por 20 s	57°C por 30 s	72°C por 2 min	1
-	94°C por 20 s	56°C por 30 s	72°C por 2 min	1
60°C por 30 min				1

3.8.5 Eletroforese Vertical com Gel de Poliacrilamida 6%

O produto da reação de amplificação seletiva para cada amostra foi aplicado (após a desnaturação a 95 °C por 5 min) em gel de poliacrilamida 6% (com uréia 7,0 M). Após a eletroforese vertical foi realizada a coloração do gel com nitrato de prata, a fim de possibilitar a visualização dos fragmentos.

As etapas desses procedimentos são apresentadas a seguir:

❖ **Gel de eletroforese:** As placas de vidro foram limpas com etanol 70% e acetona.

- As placas “Bind” (33,3 x 41,9 cm) foram tratadas com a mistura de 7,0 µL de *γ-methacryloxypropyl-trimethoxysilane* (*PlusOne Bind Silane*) (*Amersham Pharmacia Biotech.*) em 3,0 mL da solução composta por 5% de ácido acético glacial em 95% de etanol absoluto, que foi espalhada uniformemente por toda a placa e em seguida esperou-se a secagem completa. Esse tratamento é importante porque permite a ligação covalente do gel à placa.

-Já as placas “*Repel*” (33,3 x 39,4 cm) foram tratadas com 1,5 mL da solução 2% de *dimethyldichlorosilane* em *octamethyl cyclo-octasilane* (*PlusOne Repel-Silane ES*) (*Amersham Pharmacia Biotech.*) e em seguida aguardou-se a secagem. Esse tratamento permitiu a liberação do gel, no momento de separação entre as placas.

- Em seguida foi preparada a solução 30% de acrilamida (29 g de acrilamida e 1,0 g de bis-acrilamida em 100 mL de água ultra pura); e posteriormente a solução de uréia/acrilamida, produzida a partir da adição de 50 mL da solução 30% de acrilamida; 25 mL de 10X TBE (445 mM de Tris-base; 445 mM de ácido bórico; 10 mM de EDTA) e 210 g de uréia. Posteriormente foi adicionada água ultra pura estéril, em q.s.p 250 mL. A mistura foi filtrada e armazenada a 4°C em um frasco envolto por papel alumínio.

-As placas foram unidas, mas entre elas foi adicionado um espaçador de 0,4 mm e as partes tratadas foram dispostas internamente. As laterais das placas foram lacradas com fita adesiva, e em seguida essa estrutura foi preenchida com a solução de gel (70 mL da solução uréia/acrilamida; 750 µL de 10% persulfato de amônio e 45 µL de TEMED).

-Em seguida o “pente” foi inserido de forma invertida na parte superior da placa, para possibilitar a confecção de uma canaleta horizontal. Posteriormente, aguardou-se por 1 hora a polimerização do gel;

- O pente foi removido e a limpeza da canaleta foi realizada com o auxílio de uma pipeta.

-Foi realizada uma “pré-corrída” em tampão TBE 1X (89 mM de Tris-base; 89 mM de ácido bórico; 2,0 mM de EDTA) a 90 W para o aquecimento do gel até 53°C, a temperatura do gel foi indicada pela coloração de uma fita sensível à temperatura (acoplada à cuba) e teve duração de aproximadamente uma hora;

❖ **Preparo das Amostras**

-Tanto os produtos da reação de amplificação seletiva como os marcadores de tamanho molecular sofreram a adição de 5 µL de formamida, e foram desnaturados em termociclador a 95°C por 5 minutos e imersos em gelo até que fossem inseridos no gel de poliacrilamida 6%.

-O “pente”, foi novamente inserido, mas de forma invertida para a formação das canaletas de cada amostra, em seguida, alíquotas de 4,0 µL de cada amostra e dos marcadores de tamanho molecular de 50 pb, 100 pb e 1 Kb foram aplicadas nas respectivas canaletas.

- A eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6% foi realizada em 10X tampão TBE a 55 W por 120-150 minutos a 45-50°C.

❖ **Coloração com Prata**

Após a eletroforese, o gel de poliacrilamida 6% foi corado. As etapas desse procedimento estão descritas a seguir:

- As placas de vidro foram separadas;
- A Placa “Bind”, ligada ao gel, foi colocada em uma bandeja plástica;
- Adicionou-se 1000 mL da solução fixadora (etanol 10% e ácido acético 1%) e foi realizada a agitação por 10 minutos;
- A solução fixadora foi descartada e o gel foi lavado com água destilada por 1 minuto, em seguida a água foi descartada;
- Adicionou-se ao gel 1000 mL de ácido nítrico 1,5%, seguido de agitação por 3 minutos;
- A solução foi descartada e adicionou-se 1000 mL de água destilada. Foi realizada a agitação por 5 minutos, em seguida a água foi descartada;

- Procedeu-se a impregnação do gel com 1000 mL de solução de nitrato de prata (AgNO_3) 0,2% sob agitação por 20 minutos;
- A solução foi descartada e foi realizada a lavagem do gel com 1000 mL de água destilada, sob agitação por 1 minuto, em seguida a água foi descartada;
- Iniciou-se a revelação do gel por meio da adição de 250 mL de solução reveladora gelada (30 g/L de Na_2CO_3 e 0,54 mL de formaldeído 37%) e foi realizada agitação até o escurecimento da solução;
- A solução escurecida foi descartada e os 750 mL restantes da solução reveladora gelada foram adicionados, sob agitação por 10 minutos, até que fosse possível a visualização das bandas com a intensidade desejada;
- A solução foi removida e realizou-se o bloqueio da reação de revelação por meio da adição de 1000 mL de ácido acético 5% sob agitação por 5 minutos;
- Por fim, procedeu-se a última lavagem, com água, sob agitação por alguns minutos, essa foi seguida por secagem do gel em temperatura ambiente.

3.9 Detecção, Recuperação e Reamplificação dos FDE

Os FDE amplificados foram detectados a partir da visualização dos géis, com o auxílio de um transiluminador de luz branca. Após a detecção dos FDE foi realizada a excisão a partir do gel reidratado por 50 minutos e o tamanho molecular foi estimado de acordo com as distância percorridas no gel em relação aos padrões de tamanho molecular, em pares de bases (pb).

A distância percorrida para cada fragmento foi determinada manualmente com o auxílio de uma régua e calculada entre a porção superior do gel e o centro da banda observada.

Os fragmentos excisados foram eluídos em 50 μL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl e 1,0 mM de EDTA, pH 8,0) e incubação overnight a 4°C. Em seguida, foram submetidos a 60°C por 2 h, e posteriormente sofreram 3 ciclos de congelamento e descongelamento com posterior centrifugação rápida, de acordo com o realizado por Pathan et al. (2007).

Esses FDE foram submetidos a uma reação de reamplificação a fim de que o tamanho molecular detectado no gel de poliacrilamida fosse também confirmado em

gel de agarose. Para essa reação de reamplificação foi necessária uma alíquota de 10 μL de cada FDE eluído e a combinação de oligonucleotídeos seletivos utilizados anteriormente.

Nessa etapa foram mantidas as mesmas condições da reação de amplificação seletiva e foram utilizados 5,0 μL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, pH 8.8; 500 mM KCl) (Fermentas, Lituânia); 2,0 μL de MgCl_2 a 25 mM (Fermentas, Lituânia); 1,0 μL de dNTPs a 10 mM (Invitrogen Corp., CA, USA); 1,0 μL do oligonucleotídeo MseI a 10 μM (sem marcação por fluorescência) (Sigma Life Science); 1,0 μL do oligonucleotídeo EcoRI a 10 μM (sem marcação por fluorescência) (Sigma Life Science); 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas, Lituânia); e água ultra pura autoclavada em q.s.p 50 μL .

Foi utilizada, para a análise em gel de agarose 1% (p/v), uma alíquota de 8,0 μL da reação de reamplificação.

3.10 Purificação dos FDE

A purificação de cada FDE foi realizada a partir do produto da reação de reamplificação remanescente no tubo, para esse procedimento foi utilizado conjunto de reagentes Wizard® SV Gel and PCR Clean up system “kit” (Promega, Alemanha). As etapas estão detalhadas a seguir:

- Adicionou-se igual volume da solução de ligação à membrana (4,5 M de isotiocianato de guanidina e 0,5 M de acetato de potássio, pH 5,0) aos 42 μL que restaram da reação de reamplificação e homogeneizou-se a mistura;

❖ Ligação do DNA

- O referido volume foi transferido a uma minicoluna SV, unida a um tubo coletor estéril de 2,0 mL e incubou-se por 1 minuto à temperatura ambiente;
- Foi realizada a centrifugação a 16000 X g por 1 minuto;
- Descartou-se o filtrado e a minicoluna SV foi recolocada no tubo;

❖ Lavagem do DNA

- A minicoluna SV foi lavada a partir de 700 μ L de Solução de Lavagem da Membrana (10 mM de acetato de potássio, pH 5,0; 80% de etanol e 16,7 μ M de EDTA, pH 8,0), e centrifugada a 16000 X g por 1 minuto;
- O filtrado foi descartado e a minicoluna SV foi recolocada no tubo;
- Uma nova lavagem foi realizada com 500 μ L de Solução de Lavagem da membrana. Em seguida foi realizada a centrifugação por 5 minutos a 16000 X g;
- O filtrado foi descartado e a minicoluna foi recolocada no tubo coletor. Em seguida realizou-se a centrifugação por 1 minuto a 16000 X g, para eliminar qualquer resíduo de solução de lavagem.

❖ Eluição do DNA

- A minicoluna SV foi transferida para um novo tubo estéril de 1,5 mL e posteriormente adicionou-se, no centro da coluna, 40 μ L de água livre de nucleases e em seguida o conjunto foi incubado à temperatura ambiente por 5 minutos;
- Foi realizada a centrifugação por 1 minuto a 16000 X g;
- Cada FDE purificado foi estocado a - 20°C.

3.11 Clonagem dos FDE

Cada FDE foi quantificado em espectrofotômetro e em seguida foi realizada a, ligação dos fragmentos ao vetor de clonagem pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, Alemanha).

Com relação à seleção dos transformantes, o vetor apresenta um gene de resistência ao antibiótico ampicilina e um gene *LacZ*, que codifica a enzima β -galactosidase. Quando há a inserção do produto reamplificado no sítio de clonagem (*polylinker*), interrompendo a sequência do gene *LacZ*, é possível observar a coloração branca das colônias, quando na presença de x-gal (degradado pela β -galactosidase) e do indutor, o IPTG.

Além disso, o vetor é linear e apresenta uma única timina no terminal 3' em ambas as extremidades, o que facilita a polimerização do DNA. Na reação de ligação do produto ao vetor foram utilizados: 75 ng do FDE purificado; 25 ng do vetor

pGEM-T *Easy*; 5,0 µL de tampão 2X de ligação da T4 DNA Ligase; 3,0 U da enzima T4 DNA Ligase; e água ultra pura estéril em q.s.p 10 µL.

A reação foi realizada em termociclador a 4°C por 17 horas. Posteriormente, 3,0 µL da reação foram adicionados em um tubo contendo 50 µL de células de *E. coli* (cepa DH10B) quimicamente competentes, descongeladas. A referida mistura foi incubada em gelo por 30 minutos e submetida a choque térmico em banho-úmido a 42°C por 30 s e retorno ao gelo para o resfriamento do tubo.

As células foram transferidas para 1,0 mL de meio de cultura SOC [1000 µL de SOB (5 g de triptona; 1,25 g de extrato de levedura; 0,13 g de NaCl; 0,05 g de KCl – mistura com pH 7,5 - e água destilada em q.s.p 250ml); 40 µL de glicose 20% e 40 µL de MgCl₂ 1M] e incubadas a 37°C em *shaker* por 1 hora sob agitação de 220 rpm. Em seguida, as células de *E. coli* foram espalhadas em placas de Petri contendo meio 2XTY sólido, antibiótico ampicilina (50 µg/mL), X-*gal* 2% e IPTG a 100 mM.

As colônias de cor branca (transformadas) foram transferidas para placas do tipo ELISA, contendo 150 µL de meio de cultura líquido 2xTY, contendo glicerol 8% e antibiótico ampicilina (50 µg/mL) em cada poço. Em seguida as placas foram incubadas em *shaker* a 37°C sob agitação de 300 rpm durante 16 horas, e por fim foram estocadas a - 80°C.

3.12 Preparação do DNA Plasmidial

As colônias transformadas foram transferidas para placas de 96 poços tipo deep well contendo 1,0 mL de meio 2xTY e antibiótico ampicilina (50 µg/mL) com o auxílio de palitos de madeira estéreis. A incubação para o crescimento bacteriano foi realizada em *shaker* por 22 horas a 37°C sob agitação a 300 rpm;

Em seguida a placa foi centrifugada a 4000 rpm em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich), por 6 minutos a 20°C e o sobrenadante foi descartado por inversão, sendo estas deixadas de boca para baixo sobre papel absorvente durante 2 minutos.

Adicionou-se ao precipitado 140 µL da Solução I (5 ml de EDTA 0,5M, pH 8,0; 6,5 ml de Tris-HCl 1M pH 8,5. 220 ml de água ultra pura autoclavada, 2,5 g de

glicose diluída em 30 ml de água filtrada, estocada a 4°C), seguido de agitação em vórtex por 6 minutos, até que a dissolução completa do precipitado.

Repetiu-se a centrifugação por 6 minutos a 4000 rpm em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich), e o sobrenadante foi descartado por inversão. Adicionou-se 50 µL de Solução I e a agitação em vórtex e a centrifugação foram realizadas mais uma vez.

Adicionou-se a uma placa Elisa, 2,5 µL de RNase (10mg/ml) e posteriormente toda a suspensão resultante da centrifugação foi adicionada à mesma placa, além disso adicionou-se 60 µL da Solução II (150 µL de NaOH 10M, 750 µL de SDS 10% e 7,5 ml de água). As placas foram seladas e invertidas por duas vezes a fim de efetuar a mistura dos reagentes. Foi realizada uma rápida centrifugação a 1600 rpm em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich), a fim de retirar das gotas do selo.

Foram adicionados 60 µL da Solução III (29,44g de Acetato de Potássio, Ácido Acético Glacial (até atingir pH 5,4 - cerca de 11,5ml e água em q.s.p 100 ml, estocada a 4°C), as placas foram devidamente seladas e misturadas 20 vezes por inversão. Foi realizada uma rápida centrifugação a 1600 rpm em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich).

O selo das placas foi retirado e essas foram incubadas a 90°C por 30 minutos e posteriormente resfriadas em gelo por 7 minutos. Em seguida as placas foram seladas e centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich), à 20°C. Foi realizada a montagem de uma placa Elisa com filtro, para a qual foi transferido o sobrenadante. Centrifugou-se por 6 minutos a 20°C e a 4000 rpm em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich).

O filtro foi retirado após a centrifugação e adicionou-se, a cada amostra, 110 µL de Isopropanol. A placa foi selada com selo de alumínio e em seguida foi realizada a mistura por inversão (20 vezes). Centrifugou-se por 45 minutos a 20°C e a 4000 rpm em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich).

O sobrenadante foi descartado, e uma breve centrifugação com a placa invertida (aceleração e desaceleração iguais a zero) foi realizada. Adicionou-se, a cada amostra da placa, 150 µL de etanol 70% e centrifugou-se por 5 minutos a 4000 rpm em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich). O sobrenadante foi descartado e

outra breve centrifugação com a placa invertida (aceleração e desaceleração iguais a zero).

Aguardou-se a secagem da placa por 15 minutos na estufa a 37°C, e o precipitado foi ressuspenso em água ultra pura autoclavada por 1 hora.

Assim, o material foi armazenado a -20°C e posteriormente quantificado em NanoDrop ND-1000 (Uniscience), para a avaliação da qualidade e realização da diluição ideal das amostras para a reação de sequenciamento.

3.13 Sequenciamento dos FDE

Para as reações de sequenciamento foram utilizados 100 ng de DNA plasmidial, 3,0 mL de tampão de sequenciamento (Save money 2,5X), 1,0 mL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 10 picomoles do oligonucleotídeo iniciador (T7 ou SP6) e q.s.p 10 mL.

Ao término da reação de sequenciamento, que consistiu de uma desnaturação inicial de 96 °C por 1 min e de 39 ciclos compostos por uma etapa a 96 °C por 15 s, uma etapa a 47 °C (SP6)/51 °C (T7) por 15 s e uma etapa de polimerização a 60 °C por 4 minutos, em seguida as amostras foram mantidas a 4 °C.

Posteriormente, foram adicionados 80 mL de isopropanol 75% a cada reação. Decorridos 15 minutos e em temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas a 3040 x g, por 30 minutos a 20 °C. Após a precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas, duas vezes, com 200 mL de etanol 70% seguido de centrifugação a 3040 x g por 10 minutos a 20 °C.

As amostras foram secas a vácuo, ressuspendidas em 10 mL de formamida e então desnaturadas por 5 minutos a 95 °C. Em seguida as amostras foram submetidas ao sequenciamento no sequenciador automático ABI 3730 XL de acordo com as recomendações do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)).

3.14 Análise dos FDE

As sequências das amostras dos FDE foram analisadas com auxílio da infraestrutura de informática e bioinformática do CREBIO (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica) da FCAV/ UNESP. Nesse sentido, foram utilizadas ferramentas de bioinformática, tanto locais quanto via internet, e bancos de dados oficiais disponíveis publicamente na internet.

A avaliação da qualidade das sequências de nucleotídeos dos fragmentos diferencialmente expressos foram realizadas pelo conjunto de ferramentas Phred/Phrap/Consed (Ewing & Green, 1998; <http://www.phrap.org>). Em seguida procede-se as análises com o auxílio da ferramenta BLAST para a identificação de similaridades com sequências já descritas na base de dados disponível no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), nesse caso, foi adotado como limite inferior do e-value, o valor de $1e^{-5}$, para análise das similaridades.

Além disso, foram realizadas buscas em bancos de dados públicos de proteínas e domínios de proteínas, principalmente UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e ProDom (<http://prodom.prabi.fr/>). Posteriormente, com base nos dados obtidos, os FDE, apenas na variedade resistente, foram manualmente categorizados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As principais etapas do experimento, que antecederam a coleta das raízes, foram documentadas (**Figura 2**). Posteriormente foi realizada a extração do RNA total e a partir de então a integridade das amostras de RNA das variedades resistente e suscetível ao ataque por cigarrinha-das-raízes foram analisadas pelo RIN - número de integridade do *Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)* que pode variar entre 1 e 10. Os resultados obtidos apresentaram valores que variaram de 6,0 a 8,10, (**Tabela 1**), além disso, com o auxílio do “Agilent 2100 software”, foi possível observar os perfis de qualidade (**Figura 3**). É necessário observar que constam apenas os perfis de 9 amostras, pois devido a problemas técnicos com a máquina que continha as imagens, as mesmas não puderam ser obtidas. Assim, as amostras apresentaram valores que foram considerados satisfatórios para dar continuidade aos experimentos, uma vez que amostras com RIN abaixo de 6,0 indicam que o RNA está parcialmente degradado.



Figura 2. Fotos das etapas que antecederam as análises moleculares. 1 – Material vegetal em casa de vegetação; 2 – ovos de *M. fimbriolata*; 3 – Aclimação do material vegetal; 4 – suporte para a infestação por cigarrinha-das-raízes; 5 – raízes infestadas por cigarrinha; 6 – bancada preparada para a coleta das raízes.

Tabela 1. Valores de RIN, obtidos após leitura do RNA total no Bioanalyzer.

Amostra	Leitura
SP83-5073; I coleta- Controle	6,60
SP83-5073; II coleta- Controle	6,30
SP83-5073; III coleta- Controle	6,10
SP83-5073; IV coleta- Controle	7,00
SP80-1816; I coleta- Controle	6,30
SP80-1816; II coleta- Controle	6,60
SP80-1816; III coleta- Controle	6,00
SP80-1816; IV coleta- Controle	7,00
SP83-5073; I coleta- Infestada	6,60
SP83-5073; II coleta- Infestada	6,90
SP83-5073; III coleta- Infestada	6,90
SP83-5073; IV coleta- Infestada	7,20
SP80-1816; I coleta- Infestada	6,50
SP80-1816; II coleta- Infestada	6,20
SP80-1816; III coleta- Infestada	7,30
SP80-1816; IV coleta- Infestada	8,10

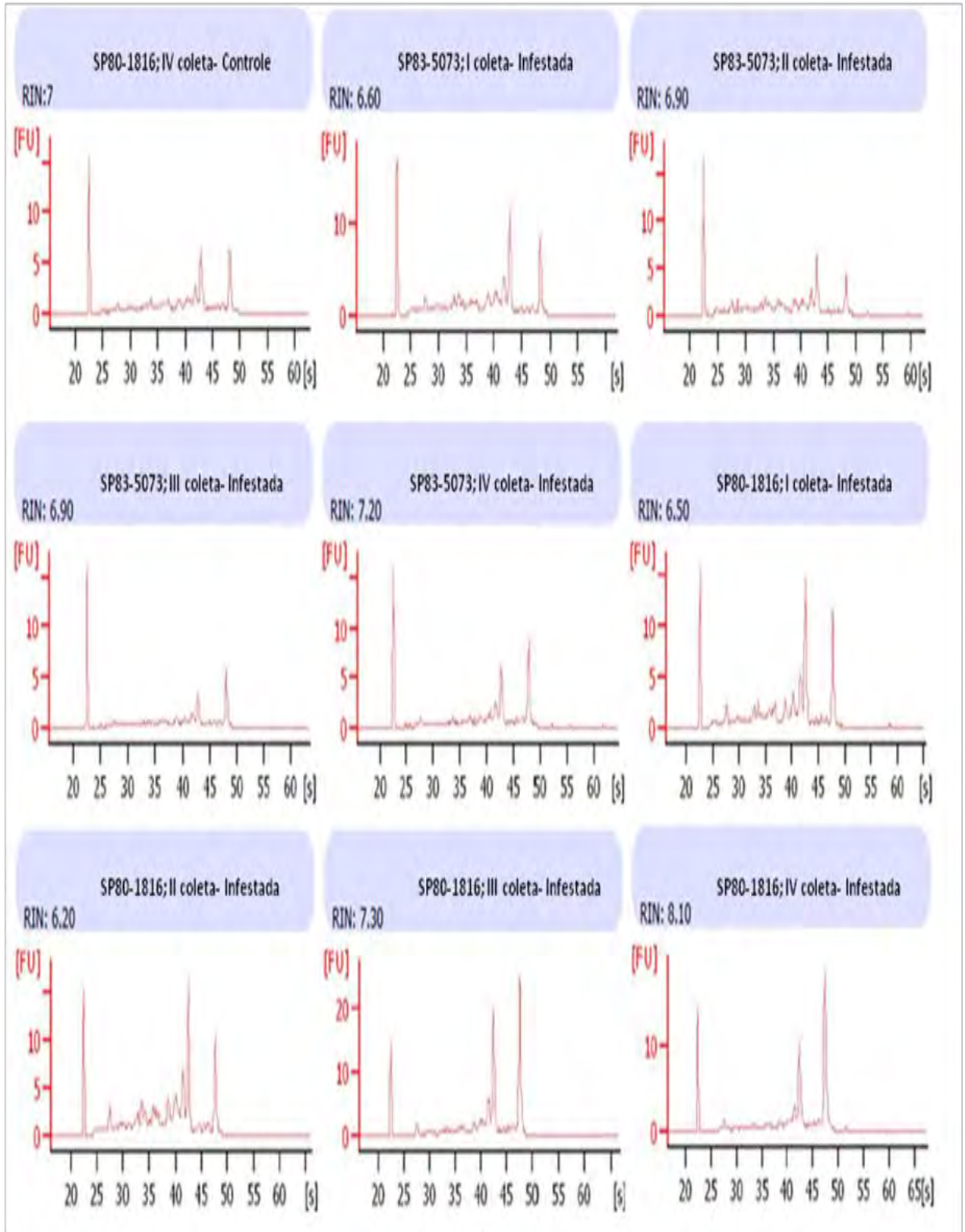


Figura 3. Imagem do programa Agilent 2100 Expert software, revelando a qualidade (RIN) do RNA extraído de 9 amostras.

Além disso, tanto o RNA total radicular como o cDNA, foram quantificados em espectrofotômetro para análise de sua qualidade (**Tabela 2 e 3, respectivamente**).

Tabela 2. Dados obtidos após leitura do RNA em espectrofotômetro.

Amostra	260/280	260/230	ng/μl
SP83-5073; I coleta- Controle	2,10	2,19	304,2
SP83-5073; II coleta- Controle	2,09	2,04	233,0
SP83-5073; III coleta- Controle	2,09	1,94	139,5
SP83-5073; IV coleta- Controle	2,13	2,40	201,2
SP80-1816; I coleta- Controle	2,11	1,75	257,2
SP80-1816; II coleta- Controle	2,13	1,93	245,3
SP80-1816; III coleta- Controle	2,06	1,59	138,7
SP80-1816; IV coleta- Controle	2,06	2,05	239,7
SP83-5073; I coleta- Infestada	2,11	1,78	359,8
SP83-5073; II coleta- Infestada	2,10	2,18	426,7
SP83-5073; III coleta- Infestada	2,10	2,24	258,8
SP83-5073; IV coleta- Infestada	2,10	2,15	212,7
SP80-1816; I coleta- Infestada	2,12	2,24	358,5
SP80-1816; II coleta- Infestada	2,12	1,98	252,2
SP80-1816; III coleta- Infestada	2,12	2,21	237,3
SP80-1816; IV coleta- Infestada	2,11	1,71	257,5

Tabela 3. Dados obtidos após leitura do cDNA em espectrofotômetro.

Amostra	260/280	260/230	ng/μl
SP83-5073; I coleta- Controle	2,06	2,22	34,0
SP83-5073; II coleta- Controle	2,13	2,16	43,0
SP83-5073; III coleta- Controle	1,92	2,07	164,8
SP83-5073; IV coleta- Controle	2,11	2,19	86,6
SP80-1816; I coleta- Controle	2,25	2,24	32,1
SP80-1816; II coleta- Controle	2,09	2,05	69,7
SP80-1816; III coleta- Controle	1,91	2,32	138,3
SP80-1816; IV coleta- Controle	2,09	2,39	165,5
SP83-5073; I coleta- Infestada	2,22	2,30	22,5
SP83-5073; II coleta- Infestada	1,84	1,80	46,4
SP83-5073; III coleta- Infestada	1,93	2,31	118,7
SP83-5073; IV coleta- Infestada	2,00	2,41	73,6
SP80-1816; I coleta- Infestada	1,89	2,30	49,8
SP80-1816; II coleta- Infestada	2,11	2,19	25,8
SP80-1816; III coleta- Infestada	1,92	2,50	131,3
SP80-1816; IV coleta- Infestada	1,89	2,34	98,3

De acordo com os resultados apresentados a relação A260/A280nm das amostras variou entre 2,06 e 2,12 para os RNAs e entre 1,84 e 2,25 para os cDNAs. Tanto o RNA como o cDNA apresentaram concentrações e qualidade ideais.

Para as relações A260/230 os resultados variaram de 1,59 a 2,40 para os RNAs e 1,8 a 2,5 para os cDNAs. De acordo com Diniz (2007), citado por Dedemo (2011), o grau de pureza é determinante para a reprodutibilidade do AFLP, por interferir na restrição e conseqüentemente, formar fragmentos parcialmente digeridos, com alto peso molecular, modificando o perfil resultante. Dessa forma, a qualidade do RNA obtido a partir de cada amostra foi satisfatória, o que permitiu o uso dos mesmos para a síntese dos cDNAs de dupla-fita e conseqüentemente a realização da técnica de cDNA-AFLP.

Foram utilizadas 3 combinações de oligonucleotídeos iniciadores, aleatoriamente escolhidos para as reações de amplificação seletiva e, para isso foram utilizadas as 16 amostras, compostas por alíquotas representativas de cada um dos 4 dias de coleta. A técnica de cDNA-AFLP foi eficiente em apresentar a expressão diferencial de 21 fragmentos a cada 1, 2, 7 e 14 dias após a infestação (**Figura 4**), sendo que a combinação ACT/CTA foi a que possibilitou um maior número de FDE (**Figura 5**).

Após a confecção da placa de gel de poliacrilamida 6%, estas amostras foram coradas, o que possibilitou a detecção dos FDE por meio da visualização de bandas. A partir do gel foram obtidos 21 FDE referentes aos 4 dias de coleta e expressos na variedade resistente em detrimento à suscetível, os quais foram clonados e sequenciados (**Tabela 4**).

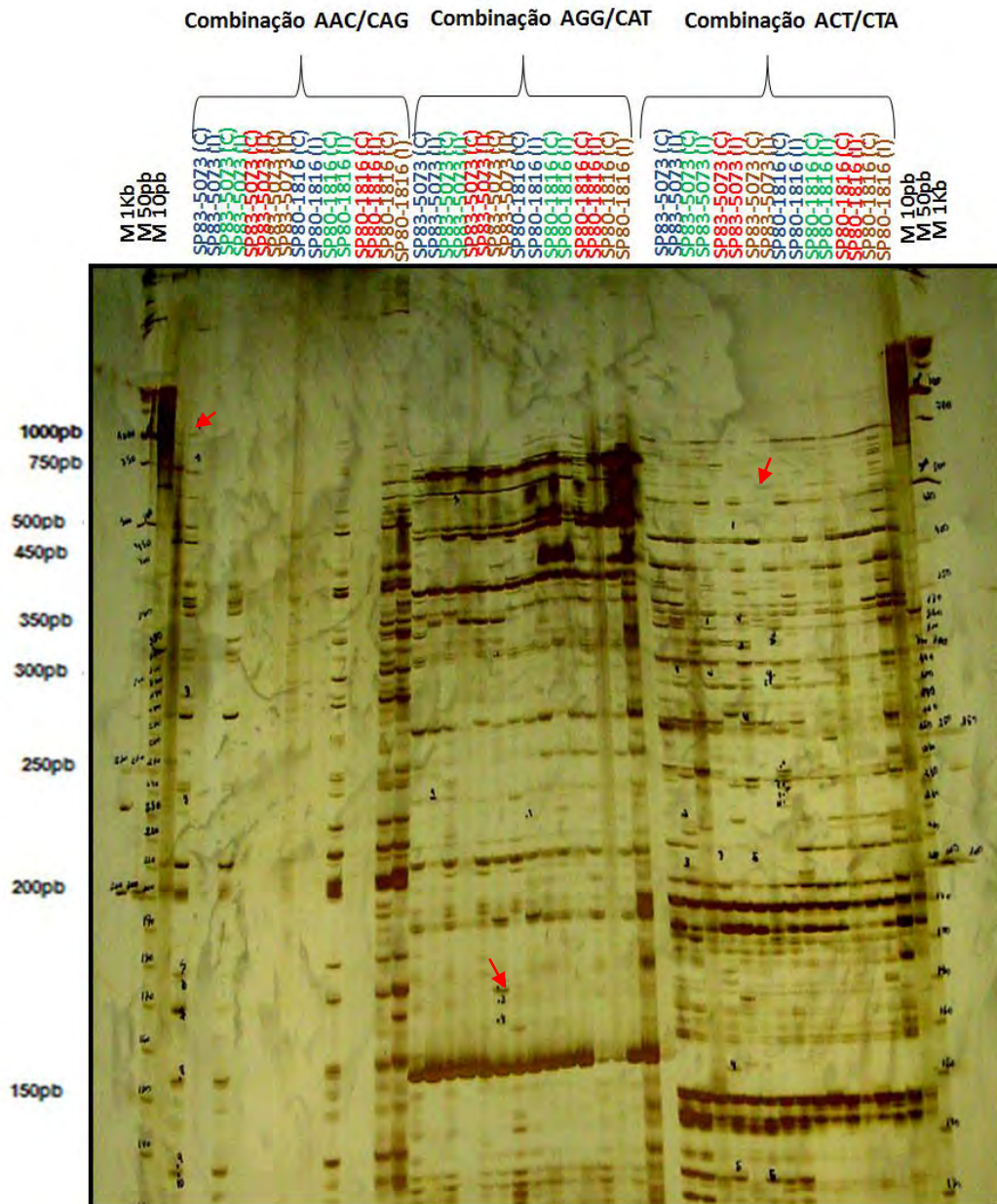


Figura 4. Perfil de expressão gênica exibido por meio da técnica cDNA-AFLP, algumas bandas diferencialmente expressas em cada combinação estão apontadas por setas . **As 3 colunas das extremidades, esquerda e direita:** marcadores de tamanho molecular de 1Kb, de 50 pb e de 10 pb; Da esquerda para a direita, **nas colunas de 4-19:** combinação AAC/CAG; **Colunas de 20 a 35:** combinação AGG/CAT; **Colunas de 36-51:** combinação ACT/CTA. As diferentes cores na nomenclatura das variedades representam o dia de coleta correspondente: Azul (primeiro dia de coleta), verde (segundo dia de coleta), vermelho (terceiro dia de coleta) e marrom (quarto dia de coleta). As letras C e I a frente do nome das variedades correspondem aos tratamentos controle e infestada, respectivamente. Algumas marcações na caneta foram realizadas sobre o vidro da placa a fim de localizar os marcadores de tamanho molecular e os genes diferencialmente expressos.

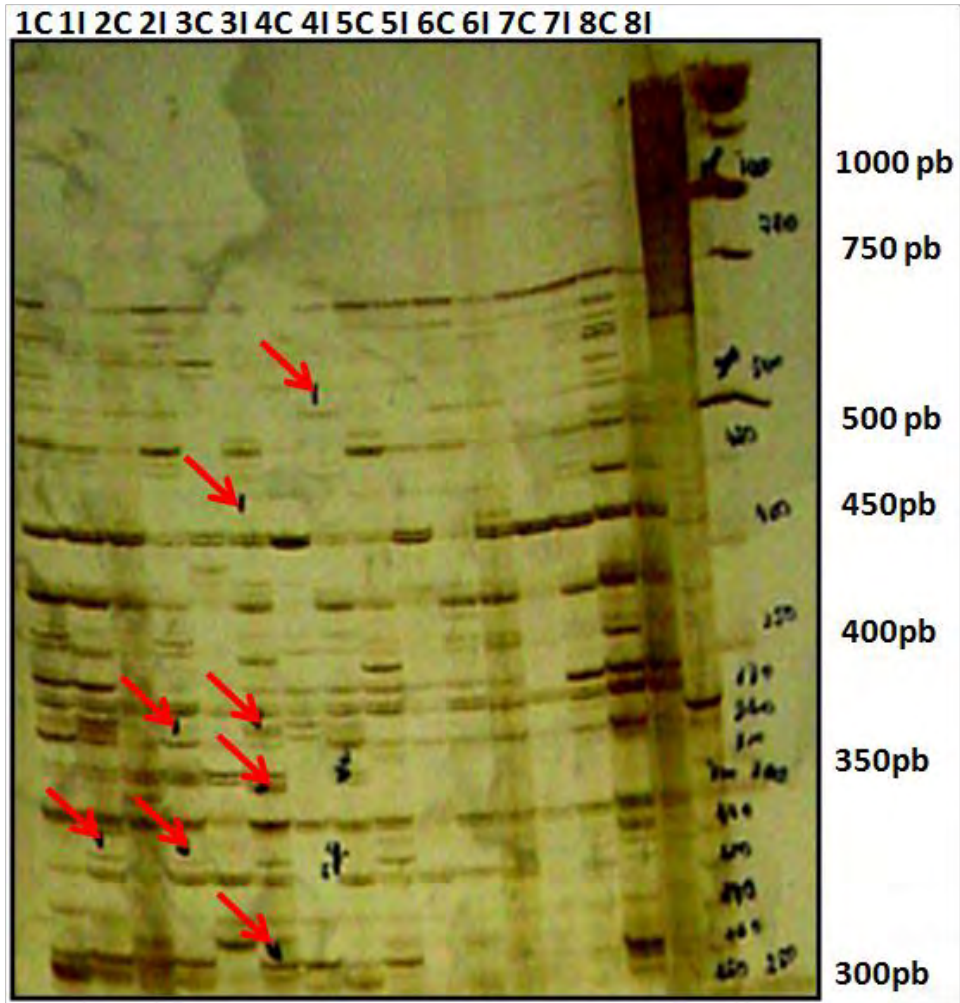


Figura 5. Detalhe de alguns dos FDE obtidos pelo uso da combinação ACT/CTA no gel de poliacrilamida 6%. As letras C e I que acompanham os números representam as plantas controle e infestadas respectivamente. A variedade SP83-5073 está representada pelos números 1 (coleta I), 2 (coleta II), 3 (coleta III) e 4 (coleta IV) e a SP80-1816 pelos números 5 (coleta I), 6 (coleta II), 7 (coleta III) e 8 (coleta IV).

Tabela 4. FDE detectados exclusivamente na resistente, SP83-5073, de cana-de-açúcar submetida à infestação por cigarrinha-das-raízes.

FDE ¹	Combinação ²	Tamanho (pb)	Nº Acesso ³	Similaridades	E-value ⁴	%Identidade
1 dia após a infestação por cigarrinha						
1	AAC-CAG	228	–	Nenhuma similaridade	–	–
2	AAC-CAG	102	–	Nenhuma similaridade	–	–
3	ACT-CTA	261	DN194380.1	SUM01-008F-C01-002.b Tecido foliar de cana Madura. Biblioteca de Saccharum híbrido, clone de cDNA cultivar CoS 767 SUM01-008F-C01-002. Sequencia 5' de RNAm	5e-05 [†]	22/33 (67%)
4	ACT-CTA	145	XP_002455617.1	Proteína hipotética de sorgo SORBIDRAFT_03g014455	3e-06*	24/30 (80%)
5	ACT-CTA	287	AAD22153.1	Poliproteína de sorgo AF061282_6	4e-23*	44/71 (62%)
6	ACT-CTA	282	XP_002448119.1	Proteína hipotética de sorgo SORBIDRAFT_06g021470	3e-20*	57/60 (95%)
7	ACT-CTA	84	–	Nenhuma similaridade	–	–
8	AGC-CTA	160	–	Nenhuma similaridade	–	–
9	AGC-CTA	100	–	Nenhuma similaridade	–	–
10	ACG-CAG	510	–	Nenhuma similaridade	–	–
11	ACG-CAG	264	–	Nenhuma similaridade	–	–
2 dias após a infestação por cigarrinha						
12		368	CA116777.1	SCACLR1130F11.g LR1 cultivar híbrida de Saccharum SP80-3280 . Clone de cDNA SCACLR1130F11 , sequencia 5' de RNAm	2e-76 [†]	341/342 (99%)
13	AGG-CAA	248	–	Nenhuma similaridade	–	–
14	AGC-CTA	672	–	Nenhuma similaridade	–	–
15	ACG-CAG	503	–	Nenhuma similaridade	–	–
16	ACG-CAG	326	–	Nenhuma similaridade	–	–
7 dias após a infestação por cigarrinha						
17	ACT-CTA	490	NP_001152066.1	yfnA – proteína hipotética de milho	4e-46*	79/82 (96%)
18	ACT-CTA	436	ACN26960.1	Proteína desconhecida de milho	3e-92*	135/141 (96%)
19	ACT-CTA	356	ACN37000.1	Proteína desconhecida de milho	3e-68*	103/112 (92%)
20	ACT-CTA	282	XP_002448119.1	Proteína hipotética de sorgo SORBIDRAFT_06g021470	3e-19*	56/60 (93%)
21	ACT-CTA	329	CA078658.1	SCRLAM1009H04.g AM1 cultivar híbrido de Saccharum SP80-3280 clone de cDNA SCRLAM1009H04, sequencia 5' de RNAm	1e-29 [†]	53/63 (84%)
22	ACT-CTA	329	CA078658.1	SCRLAM1009H04. g AM1 cultivar híbrido de Saccharum SP80-3280 clone de cDNA SCRLAM1009H04 sequencia 5' de RNAm	3e-30 [†]	53/63 (84%)
23	ACT-CTA	309	XP_002438671.1	Proteína hipotética de sorgo SORBIDRAFT_10g024070	7e-08*	26/28 (93%)
24	ACT-CTA	231	–	Nenhuma similaridade	–	–

continuação							
25	ACT-CTA	232	–	Nenhuma similaridade	–	–	
26	ACT-CTA	528	XP_002489173.1	Proteína hipotética de sorgo SORBIDRAFT_0014s005210	1e-47*	80/13 (58%)	
27	ACT-CTA	528	XP_002538165.1	Proteína hipotética conservada de mamona	3e-22	66/127 (52%)	
28	ACG-CAG	633	–	Nenhuma similaridade	–	–	
29	ACG-CAG	1142	–	Nenhuma similaridade	–	–	
14 dias após a infestação por cigarrinha							
30	ACT-CTA	528	XP_002538165.1	Proteína hipotética conservada de mamona	3e-22*	66/127 (52%)	
31	ACT-CTA	312	–	Nenhuma similaridade	–	–	
32	AGG-CAA	177	–	Nenhuma similaridade	–	–	
33	AGG-CAA	132	–	Nenhuma similaridade	–	–	
34	AGG-CAA	98	–	Nenhuma similaridade	–	–	
35	AGC-CTA	608	–	Nenhuma similaridade	–	–	
36	AGC-CTA	329	–	Nenhuma similaridade	–	–	
37	AGC-CTA	296	–	Nenhuma similaridade	–	–	

¹ FDE gerados a partir dos oligonucleotídeos seletivos

² Combinações de oligonucleotídeos

³ Número de acesso no GenBank

⁴ O E-value, usado para indicar a significância da similaridade da sequência

* Alinhamento usando a ferramenta TBLASTX; * Alinhamento usando a ferramenta BLASTX; † Alinhamento usando a ferramenta BLASTN.

É possível notar que o fragmento 4 (primeiro dia de infestação) apresentou similaridade com uma proteína hipotética de sorgo denominada SORBIDRAFT_03g014455, cuja pesquisa de sua sequência contra o banco de dados de proteína (Uniprot) não apresentou dados referentes a suas funções moleculares e localização celular. O cruzamento de referência contra outras bases de dados de domínios e famílias demonstrou relação com a família de proteínas transposases. Sabe-se que essas proteínas são necessárias à transposição eficiente no DNA, e podemos considerar esse resultado um importante indício da relação de elementos transponíveis para a resistência dessa variedade. Nesse sentido, cabe ressaltar a importância do estudo dos elementos transponíveis relacionados ao estresse. Os elementos transponíveis foram primeiramente sugeridos por McClintock (1965) que os associou a uma resposta ao estresse e, a partir de então outros estudos, com diferentes organismos, se voltaram para investigar esses elementos em diversas condições; tais como respostas à exposição UV, temperatura, radiação, infecção por patógenos, entre outros (SLOTKIN & MARTIENSSSEN, 2007). Segundo Slotkin e Martienssen (2007), o estresse reativado

por esses elementos pode gerar a diversidade que uma espécie necessita, ao longo do tempo evolutivo, para sobreviver a um estresse específico, de modo que esse dado nos apresenta a necessidade de novos estudos de similaridade de transcritos com elementos transponíveis e/ou proteínas relacionadas, uma vez que irão possibilitar a compreensão de uma possível relação com a condição de resistência de variedades de cana-de-açúcar sob infestação por cigarrinha-das-raízes.

O fragmento 5, observado no primeiro dia de coleta, apresentou similaridade a uma poliproteína de sorgo, denominada AF061282_6. De acordo com as informações no *Gene Ontology (GO)* essa proteína está relacionada com o processo biológico de integração do DNA, replicação do DNA dependente do RNA e proteólise. Além disso, está envolvida com as funções moleculares de ligação do RNA, atividade de polimerase do DNA direcionada pelo RNA, atividade de endopeptidase do tipo aspártica e ligação do íon zinco e apresenta dentre alguns domínios, que compreendem: à RNaseH, integrase e peptidase aspártica. Quando a sequência referida foi submetida contra o banco de dados de domínios proteicos (Prodom) apresentou similaridade com uma provável proteína de retrotransposon da subclasse *Ty3-gypsy*. Esse resultado vem a complementar o estudo das evidências da relação de elementos transponíveis com a variedade resistente de cigarrinha-das-raízes. Os retrotransposons são elementos genéticos móveis que se transpõem através da transcrição reversa, por meio de um intermediário de RNA (Kumar & Bennetzen, 1999) e podem ser divididos em dois grupos, os que apresentam as repetições terminais LTRs e os que não as apresentam. Segundo Kumar & Bennetzen (1999), esses elementos estão presentes em um alto número de cópias na maioria das plantas, tornando-os os principais constituintes do genoma das plantas. Os retrotransposons que apresentam LTRs são divididos em dois grupos, o *Ty1-copia* e *Ty3-gypsy*, que se diferem pela ordem dos genes, sendo que os *Ty3-gypsy*, com o qual foi constatada uma similaridade de nosso FDE, apresentam uma organização semelhante aos retrovírus. Dedemo (2011) também relatou similaridade com essa subclasse de retrotransposon, em seu estudo de expressão gênica diferencial de cana-de-açúcar para a tolerância à seca, através da técnica de cDNA-AFLP. Esse dado nos leva a relacionar esses retrotransposons tanto a vias de estresses bióticos, quanto abióticos.

A proteína correspondente ao fragmento 6, observado no primeiro dia de infestação, também foi identificada no sétimo dia após a infestação (fragmento 12) e se trata de uma proteína hipotética de sorgo, denominada SORBIDRAFT_06g021470, cujas funções moleculares exibidas pelo GO compreendem ligação do RNA e ligação de nucleotídeos, atuando no processo biológico de processamento do RNA.

Com relação às similaridades dos FDE referentes ao 7º dia de infestação por cigarrinha-das-raízes, são apresentadas 11 proteínas. A proteína hipotética de milho, correspondente ao fragmento 9, denominada yfnA, apresentou similaridade com permeases de aminoácidos e além disso dispõe da função molecular referente à atividade transmembrana de transportador de aminoácido. A análise posterior da sequência contra o banco de dados de domínio protéicos, confirmou com similaridades, exibindo alguns domínios protéicos para permeases. Segundo Liu e Bush (2006), parece claro que, devido ao grande número de transportadores de aminoácidos em plantas, eles sejam funcionalmente diferenciados, com base nas células do substrato, padrões de expressão dos tecidos, desenvolvimento e ambiente. Todavia, o conhecimento da expressão desses genes transportadores e como eles podem estar relacionados ao estresse biótico em cana-de-açúcar ocasionado por pragas, especialmente pela cigarrinha, é de grande importância, e nada a esse respeito foi constatado na literatura, em detrimento a estudos de estresse abiótico.

Para o fragmento 10, no sétimo dia após a infestação, foram observados dois fragmentos (10 e 11), ambos com similaridade a proteínas desconhecidas do milho, cujos números de acesso no NCBI correspondem a ACN26960.1 e ACN37000, respectivamente.

No fragmento 15, no sétimo dia após a infestação, foi observada similaridade com uma proteína hipotética de sorgo, SORBIDRAFT_10g024070, que está envolvida no processo biológico de metabolismo da L-arabinose, um polímero constituinte da parede celular vegetal e que apresenta domínio de glicosil hidrolase de função desconhecida. Sabe-se que glicosil hidrolases clivam as ligações glicosídicas presentes nas estruturas poliméricas, e que podem estar relacionadas à resposta a vários estresses, como as quitinases (GOMES et al., 2009).

Os fragmentos, 18 e 19, observados no sétimo dia após infestação, apresentaram, respectivamente, similaridade com uma proteína hipotética de sorgo, SORBIDRAFT_0014s005210 e uma proteína hipotética conservada de mamona, (também similar ao fragmento 20, referente ao décimo quarto dia após a infestação), entretanto, as funções moleculares e suas relações com outros domínios proteicos, para ambas, não estão disponíveis no GO.

Dentre os FDE apresentados, alguns exibiram baixa ou nenhuma similaridade com as sequências dos bancos de dados. De acordo com as informações obtidas os FDE foram categorizados. Assim é possível considerar que, com base na totalidade analisada, 57,14% dos FDE não puderam ser classificados; 38,10% dos FDE são proteínas hipotéticas conservadas e, por fim, 4,76% dos FDE são elementos genéticos móveis (**Figura 6**). A ausência de similaridades dos genes nos bancos de dados consultados sugere que possam codificar proteínas que ainda não foram descritas, e que estejam relacionadas com a resistência à *M. fimbriolata* da variedade de cana-de-açúcar SP83-5073.

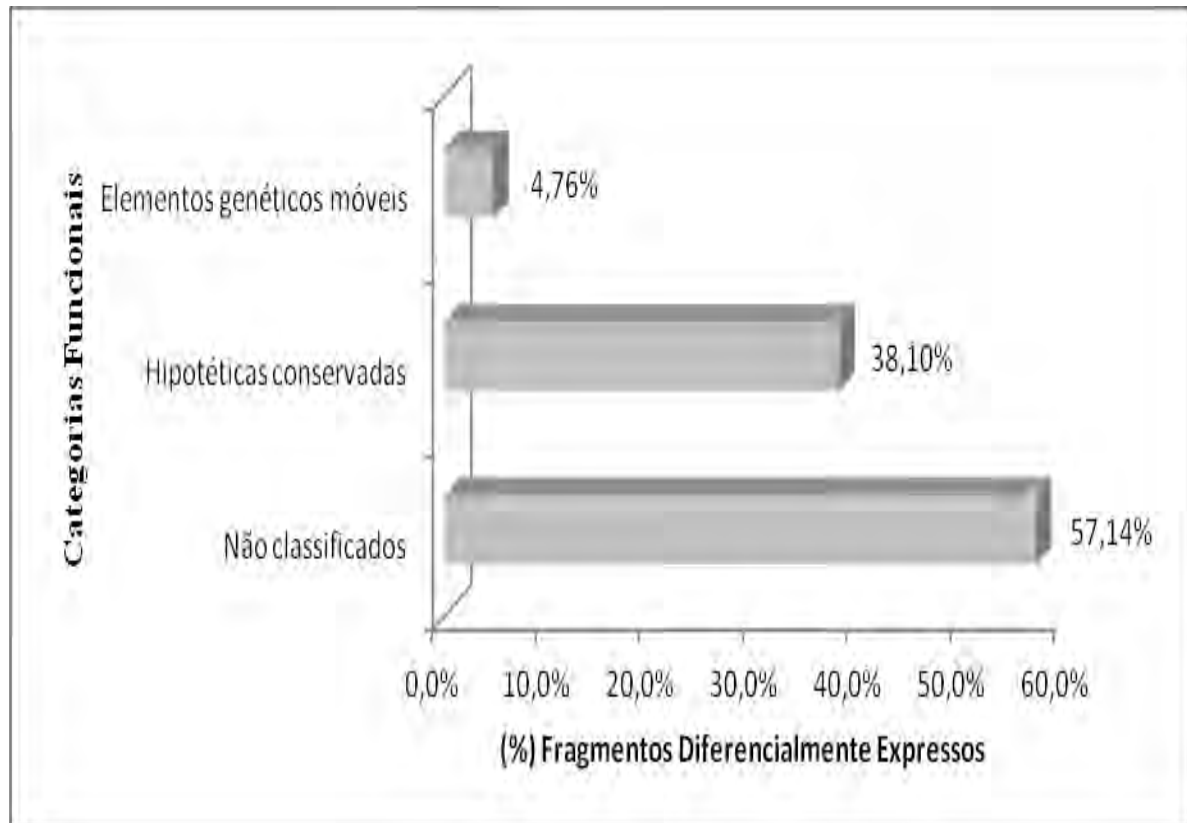


Figura 6. Categorização funcional dos fragmentos diferencialmente expressos em raízes da variedade resistente ao ataque por cigarrinha-das-raízes, a partir das similaridades obtidas nas bases de dados UniProtKB e Prodom.

5 CONCLUSÕES

- ❖ A análise comparativa entre as variedades de cana-de-açúcar resistente (SP83-5073) e suscetível (SP80-1816) ao ataque por cigarrinha-das-raízes por meio da técnica de cDNA-AFLP foi eficiente, por apresentar a expressão gênica diferencial.
- ❖ Além disso, foi possível analisar as similaridades das sequências referentes aos fragmentos diferencialmente expressos.

6 REFERÊNCIAS

ALBA, R.; FEI, Z.; PAYTON, P.; LIU, Y.; MOORE, S. L.; DEBBIE, P.; COHN, J.; D'ASCENZO, M.; GORDON, J. S.; ROSE, J. K. C.; MARTIN, G.; TANKSLEY, S. D.; BOUZAYEN, M.; JAHN, M. M.; GIOVANNONI, G. ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *The Plant Journal*, Oxford, v.39, n.5, p.697-714, 2004.

ALMEIDA, J.E.M.; FILHO, A.B.; SANTOS, A.S. Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (Hom., Cercopidae) com o fungo *Metarhizium anisopliae* em variedades de cana-de-açúcar e diferentes épocas de corte. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.70, n.1, p. 101-103, 2003.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v.215, p.403–410, 1990.

APPLIED BIOSYSTEMS — PE. **AFLP Plant Mapping Protocol**. 1997, 45p. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040959.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2012.

BACHEM, C. W.; OOMEN R. J. F.; VISSER, R. G. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, Georgia, v.16, p. 157-173, 1998.

BLEARS, M. J.; DE GRANDIS, S. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 21, p. 99-114, 1998.

BORRÁS-HIDALGO, O.; THOMMA, B. P. H. J.; CARMONA, E.; BORROTO, C. J.; PUJOL, M.; ARENCIBIA, A.; LOPEZ, J. Identification of sugarcane genes induced in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 43, p. 1115–1121, 2005.

CAPUTO, M.M.; BEAUCLAIR, E.G.F.; SILVA, M.A.; PIEDADE, S.M.S. Resposta de genótipos de cana-de-açúcar à aplicação de indutores de maturação. **Bragantia**, v.67, n.1, p.15-23, 2008.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2º levantamento de cana-de-açúcar) – Agosto de 2012. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>> Acesso em: 10 dez. 2012.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 19, p. 1-8, 2001.

DEDEMO, G, C. **Estudo da expressão gênica entre cultivares de cana-de-açúcar contrastantes para a tolerância à seca**. 2011. 108p. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar**. 1. ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 2003. 72 p.

DINARDO-MIRANDA, L. L., FERREIRA, J. M.G., CARVALHO, P. A.M. Influência da época de colheita e do genótipo de cana-de-açúcar sobre a infestação de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, vol.30, no.1, p.145-149, mar. 2001.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Manejo de nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar. In: CAMPOS, A.P.; VALE, D.W.; ARAÚJO, E.S.; CORRADI, M.M.; YAMAUTI, M.S.; FERNANDES, O.A.; FREITAS, S. **Manejo integrado de pragas**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p.59-80.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. (Ed.) **Pragas de Solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa, 2004. p. 495-516.

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

GARCIA, J. F.; BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Scientia agrícola**, Piracicaba, v.63, n.4, p.317-320, 2006.

GARCIA, J. F.; GRISOTO, E.; BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P.; GLÓRIA, B. A. Feeding site of the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.64, n. 5, p.555-557, 2007.

GOMES, L. P.; OLIVEIRA, C. I. R; SILVA, M. C; ANDRADE, C. T.; AGUILA, E. M. D.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Purificação e caracterização da quitinase de uva (*Vitis vinífera* L. cv red globe) para a produção de quitosana a partir de quitina de camarão. **Química Nova**, v.33, n. 9, p.1882-1886, 2010.

GRISOTO, E. **Resistência de Gramíneas a *Mahanarva fimbriolata* (STAL, 1854) (Hemiptera: Cercopidae)**. 2008. 56p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GUIMARÃES, E. R. **Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar: resistência genotípica e interação planta-praga**. 2007. 53p. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

KUMAR, A.; BENNETZEN, J.L. **Plant retrotransposons**. Annual Review of Genetics, v.33, p.479–532, 1999.

LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 336 p.

LESTARI, P.; VAN, K.; KIM, M. Y.; HWANG, C. H.; LEE, B. W.; LEE, S.-H. Differentially expressed genes related to symbiotic association in a supernodulating soybean mutant and its wild-type. **Molecular Plant Pathology**, v.7, n. 4, p.235-247, 2006.

LIU, X.; BUSH, D. R. Expression and transcriptional regulation of amino acid transporters in plants. **Amino Acids**, v.30, p.113–120, 2006.

MACEDO, D.; ALVES, S.B.; VIEIRA, S.A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. a *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n.1, p.47-52, 2006.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Cana-de-açúcar. Disponível em: <www.agricultura.com.br>. Acesso em 18 Jan. 2013.

MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA JR., G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, v. 58,n. 2, p. 295-301, 2001.

MCCLINTOCK, B. The Significance of Responses of the Genome to Challenge. **Science**, v.226, p.792-801, 1984.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMARTION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 11 dez. 2012.

PATHAN, A. A. K.; DEVI, K. U.; VOGEL, H.; REINEKE, A. Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. **Fungal Genetics and Biology**, v.44, p.1231-1241, 2007.

ProDom database. Disponível em: <<http://prodom.prabi.fr/>>. Acesso em 13 dez. 2012.

RAVANELI, G, C. **Qualidade da matéria-prima, microbiota fermentativa e produção de etanol sob ataque de Mahanarva fimbriolata em cana-de-açúcar.** 2010. 90p. Tese (Doutorado em Microbiologia – Microbiologia Agropecuária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2^a ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SÃO PAULO (Estado). **Legislação de São Paulo.** Disponível em: <<http://www.legislacao.sp.gov.br>>. Acesso em: 01mar. 2012.

SILVA, R.J.N., GUIMARÃES, E.R., GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M.; FERRO, M.I.T.; MUTTON, M.A.; MUTTON, M.J.R. Infestation of froghopper nymphs changes the amounts of total phenolics in sugarcane. **Scientia Agricola**, v.62, n. 6, p.543-546, 2005.

SLOTKIN, R.K., AND MARTIENSSEN, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. **Nature Reviews Genetics**, v.8, p.272–285, 2007.

TOPPA, E.V.B., JADOSK, C.J., JULIANETTI, A., HULSHOF, T., ONO, E.O., RODRIGUES, J.D. Aspectos da fisiologia de produção da cana-de-açúcar (*Saccharum Officinarum* L.). **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.3, n.3, p.215-221, 2010.

TOWNSEND, C.R.; TEIXEIRA, C.A.D.; SILVA NETTO, F.G. da; PEREIRA, R.G. de A.; COSTA, N. de L. **Cigarrinha das pastagens em Rondônia: diagnóstico e medidas de controle.** Porto Velho: EMBRAPA, 2001. 29p. (Documento, 53).

UNIPROT. Disponível em: <<http://www.expasy.uniprot.org/>> Acesso em: 12 dez. 2012.

VALÉRIO, J. R.; KOLLER, W. W. Proposição para o manejo integrado das cigarrinhas-das-pastagens. *Pasturas Tropicales*. 15 (3): 10-16, 1993.

VASCONCELOS, A.C.M.; DINARDO-MIRANDA, L.L. **Dinâmica do desenvolvimento radicular da cana-de-açúcar e implicações no controle de nematóides**. 2 ed. 2010. 56p.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; PELEMAN, J.; KULPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n. 21, p.4407-4414, 1995.

VETTORE A. L.; DA SILVA, F. R.; KEMPER, E.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.24, n. 1-4, p.1-7, 2001.

7 IMPLICAÇÕES

Para a complementação desse trabalho é possível considerar o teste das amostras de cDNA com novas combinações de oligonucleotídeos seletivos, a fim de obter um maior número de FDE que possibilitem novas análises. Além disso, os dados obtidos podem ser corroborados com o uso de uma técnica molecular adicional, como o qRT-PCR.