

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS PARA
RESISTÊNCIA AO MOSAICO DA CANA-DE-AÇÚCAR A
PARTIR DA TÉCNICA DE cDNA-AFLP**

Cibele Nataliane Facioli Medeiros

Engenheira Agrônoma

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS PARA
RESISTÊNCIA AO MOSAICO DA CANA-DE-AÇÚCAR A
PARTIR DA TÉCNICA DE cDNA-AFLP**

Cibele Nataliane Facioli Medeiros

Orientador: Profa. Dra. Luciana Rossini Pinto

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Cesar Gonçalves

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

Medeiros, Cibele Nataliane Facioli
M488i Identificação de genes candidatos para resistência ao mosaico da cana-de-açúcar a partir da técnica de cDNA-AFLP/ Cibele Nataliane Facioli
Medeiros. – – Jaboticabal, 2013
iv, 46 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: Luciana Rossini Pinto

Coorientador: Marcos Cesar Gonçalves

Banca examinadora: Janete Aparecida Desidério, Ricardo Harakava

Bibliografia

1. Potyvirus 2. Expressão diferencial 3. Saccharum spp. 4. SCMV. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:633.61

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS PARA RESISTÊNCIA AO MOSAICO DA CANA-DE-AÇÚCAR A PARTIR DA TÉCNICA DE cDNA-AFLP

AUTORA: CIBELE NATALIANE FACIOLI MEDEIROS

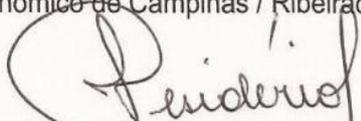
ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCOS CESAR GONÇALVES

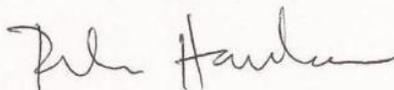
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO
Instituto Agronômico de Campinas / Ribeirão Preto/SP



Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO
Departamento de Biologia Aplicada / Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. RICARDO HARA KAVA
Instituto Biológico / São Paulo/SP

Data da realização: 10 de dezembro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CIBELE NATALIANE FACIOLI MEDEIROS, nasceu em 25 de março de 1986 na cidade de Ribeirão Preto, que fica localizada no estado de São Paulo, filha de Euripa de Fátima Oliveira Facioli Medeiros e Itamar de Medeiros. Em 2007 ingressou no curso de Agronomia do Centro Universitário Moura Lacerda - CUML, onde em julho de 2011, graduou-se com o título de Engenheira Agrônoma. Durante a graduação foi bolsista por um ano (2008) de iniciação científica (PIC/CUML) na área de Morfologia Vegetal. Ainda durante a graduação estagiou no Laboratório de Biotecnologia do Centro Avançado da Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana - IAC/Apta, onde desenvolveu projeto de iniciação científica financiado pela FAPESP (Processo 2009/51121-7) por dois anos (2009-2010/ 2010-2011). Ingressou no curso de mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Jaboticabal-SP, em agosto de 2011, foi bolsista inicialmente da CAPES onde em seguida passou a ser bolsista da FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), processo 2012/15060-6.

*“Veja!
Não diga que a canção
Está perdida
Tenha fé em Deus
Tenha fé na vida
Tente outra vez!”*

Raul Seixas

Dedico

Aos meus amores, meus pais: ***Euripa de Fátima (Preta)*** e ***Itamar de Medeiros***, por serem meus exemplos de vida, integridade e respeito, são pessoas que não mediram esforços para nos dar o melhor e incentivar para seguirmos fortes em busca dos nossos sonhos!

Ofereço

Aos meus irmãos, ***Michele, Carol*** e ***Artur***, por serem um pedacinho de mim, pelos momentos de felicidade que passamos quando estamos todos reunidos!

Agradeço

À minha mãezinha ***Nossa Senhora Aparecida*** por me amparar em todos os momentos...

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser o meu refúgio, por me dar forças para seguir em frente diante às dificuldades, por iluminar minha caminhada e guiar meus passos.

Aos **meus pais**, pelo imenso amor e dedicação, por terem me dado a melhor educação, baseada no respeito ao próximo e a mim mesma.

Às **minhas irmãs**, pelo apoio, incentivo e por compreenderem a minha ausência durante a realização deste trabalho.

Ao meu irmão **Artur**, um presente de Deus para nossa família, para quem eu quero ser exemplo e buscar sempre o melhor.

À **Mariana**, por ser presente, pela dedicação e carinho infinitos e por acreditar em mim, não só como pessoa, mas como profissional.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal**, pela oportunidade da realização do mestrado por meio do curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

Ao **Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas** pela oportunidade e aprendizado durante todos esses anos e a todos os funcionários pelo imenso carinho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pela concessão da bolsa de estudo (Processo: 2012/15060-6).

À professora **Dra. Luciana Rossini Pinto**, pela orientação, confiança, amizade, por todos os ensinamentos não somente relacionados à vida profissional, mas também pessoal. Meus sinceros agradecimentos pelo apoio durante todos esses anos de convivência, pelo carinho e por ser um exemplo que levarei para o resto da vida.

Ao **Dr. Marcos Cesar Gonçalves** pela co-orientação, pelos valiosos ensinamentos, pelo exemplo de competência e comprometimento com a ciência.

À **Dra. Silvana Aparecida Creste** pesquisadora do Centro de Cana/IAC por disponibilizar o material utilizado e pelas sugestões.

Ao **Dr. Michael dos Santos Brito**, pela amizade, pela disponibilidade e pelos ensinamentos principalmente durante a instalação do experimento e análise das sequências.

À **Dra. Paula Macedo Nobile**, pelas diversas contribuições principalmente relacionadas à extração e manipulação de RNAs, pela experiência dividida, além da amizade e carinho cultivados.

Ao pesquisador **Dr. Ricardo Harakava** do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico pela ajuda com a clonagem, sequenciamento e também com as análises de bioinformática, pela disponibilidade em me receber, meus sinceros agradecimentos.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana, **Alexandre, Beatriz, Bruna Turcatto, Camila, Carol Pani, Carol Tardiani, Débora, Gabriela, Izadora, João Ricardo, Juliana Borges, Lívia, Luiz, Izadora, Marcel, Mariana, Maicon, Silvan e Vanessa**, pelos ensinamentos, compreensão, assistência e pelos bons momentos de descontração.

Aos meus queridos amigos não só do Laboratório de Biotecnologia: **Bruna Gonçalves**, pelo carinho, confiança e pela disponibilidade em dividir o conhecimento com todos; **Carol Neuber**, pela ajuda com as inoculações das plantas, pelo incentivo e amizade sincera; **Maria Letícia e Maria Natália** por estarem sempre dispostas a me ajudar, pelo coração gigante e carinho; **Fernanda**, pelo incentivo, ajuda e por me animar com o seu bom e único humor; **Larissa** por ter sempre palavras confortantes; **Rafael**, pelas conversas, caronas e confiança e **Thaís**, pelos longos anos de amizade, de cumplicidade e pelo verdadeiro carinho.

A todos os **amigos e colegas da pós-graduação** em Genética e Melhoramento de Plantas, em especial ao meu grande amigo **Willame dos Santos Cândido**, pela amizade, pelos momentos engraçados e por ter me mostrado o quanto o ser humano pode ser adorável e generoso com o próximo. A você o meu respeito e admiração!

A **Msc. Lúcia Lopes**, pela amizade durante a pós-graduação e principalmente pela disposição em me ajudar com a análise das sequências.

Aos membros da banca de qualificação e defesa **Dra. Luciana Rossini Pinto, Dr. Alessandro de Melo Varani, Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, Dr. Ricardo Harakava e Dra. Janete Aparecida Desidério**, pela disponibilidade em participar da defesa da dissertação de mestrado e dar importante colaboração para aperfeiçoar o trabalho.

A todos os meus **amigos e familiares**, que torceram por mim e contribuíram para a realização de mais uma etapa na minha vida.

A todos os **brasileiros** que com o seu trabalho mantêm os órgãos de fomento, os quais disponibilizam auxílio financeiro necessário à realização de trabalhos como este.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!!!

SUMÁRIO

Páginas

RESUMO.....	iii
ABSTRACT -	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A cultura da cana-de-açúcar	3
2.2 Vírus do mosaico da cana-de-açúcar (SCMV)	3
2.3 A técnica de cDNA-AFLP	5
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Material vegetal	10
3.2 Condução do experimento	10
3.3 Inoculação com o SCMV – estirpe Rib-1	11
3.4 Coleta do tecido vegetal.....	12
3.5 Extração do RNA total.....	13
3.6 Quantificação e integridade dos RNAs	13
3.7 Comprovação da presença do vírus por diagnóstico molecular (RT-PCR).....	14
3.8 Síntese do cDNA de dupla-fita	14
3.9 A técnica de cDNA – AFLP	14
3.9.1 Digestão dos cDNAs.....	15
3.9.2 Ligação de adaptadores	15
3.9.3 Pré-amplificação	15
3.9.4 Amplificação seletiva	16
3.9.5 Separação dos fragmentos de cDNA-AFLP	17
3.10 Detecção, Recuperação e Reamplificação dos FDE	17

3.11 Purificação, clonagem e sequenciamento dos FDEs	18
3.12 Análise das sequências	19
4 RESULTADOS	20
4.1 Observação dos sintomas em casa de vegetação após a inoculação com o SCMV Rib-1	20
4.2 Quantificação e Integridade dos RNAs	21
4.3 Comprovação da presença do vírus por diagnóstico molecular (RT-PCR).....	23
4.4 Obtenção dos Fragmentos Diferencialmente Expressos (FDEs) via cDNA- AFLP	24
4.5 Comportamento dos FDEs ao longo dos tempos de amostragens (horas após a inoculação).....	25
4.6 Identificação de FDEs exclusivos da variedade resistente (IACSP95-5000) ...	27
4.7 Clonagem e sequenciamento dos FDEs.....	30
4.8 Análise das Sequências dos FDEs	32
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÕES	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS PARA RESISTÊNCIA AO MOSAICO DA CANA-DE-AÇÚCAR A PARTIR DA TÉCNICA DE cDNA-AFLP

RESUMO- A doença do mosaico da cana-de-açúcar, causada pelo *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), é uma das principais doenças incidentes na cultura. Para compreender a base molecular dessa interação planta-patógeno o presente trabalho objetivou identificar potenciais genes candidatos à resistência ao mosaico através da técnica de cDNA-AFLP utilizando duas variedades contrastantes quanto a resistência ao SCMV (estirpe Rib-1). Plantas das variedades IACSP95-5000 (resistente) e IAC91-1099 (suscetível) obtidas por micromeristemas foram inoculadas com a estirpe Rib-1 em condições controladas de casa de vegetação para a identificação de fragmentos diferencialmente expressos (FDE) nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hpi). No total, foram obtidos 772 FDEs, dos quais 392 observados na variedade resistente e 380 na suscetível. As variedades apresentaram comportamento diferencial quanto ao número de FDEs induzidos e reprimidos ao longo dos tempos de amostragens (24, 48 e 72 hpi). A variedade resistente apresentou um número maior de FDEs, correspondentes a prováveis genes induzidos no tempo de 24 hpi em relação a suscetível, diminuindo com o passar do tempo de inoculação, enquanto o número de FDEs correspondentes a prováveis genes induzidos aumentou com o tempo de inoculação na variedade suscetível. Sessenta e seis FDEs foram identificados exclusivamente na variedade resistente, sendo que 9 foram reprimidos e 57 induzidos após a inoculação com o SCMV. Destes 57, 23 foram sequenciados e destes, 10 FDEs mostraram identidade com sequências conhecidas de plantas, sendo a maioria relacionada com mecanismos de defesa da planta contra o patógeno e 3 FDEs não apresentam identidades com sequências descritas e podem exercer papel importante no mecanismo de resistência. A técnica de cDNA-AFLP foi eficiente em revelar alterações do perfil de transcrição dentro e entre as variedades contrastantes quando desafiadas pelo vírus do mosaico. O conjunto total de FDEs pode ser um recurso importante para estudos que visam compreender o mecanismo de resistência, como também para o desenvolvimento de marcadores moleculares a serem utilizados no mapeamento genético para à resistência ao mosaico da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Potyvirus*, expressão diferencial, *Saccharum spp.*, SCMV

IDENTIFICATION OF CANDIDATE GENES FOR *SUGARCANE MOSAIC VIRUS* RESISTANCE THROUGH cDNA-AFLP TECHNIQUE

ABSTRACT - The sugarcane mosaic disease caused by the Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) is a major disease incident in this crop. To understand the molecular basis of the plant pathogen interaction, the present study aimed to identify potential candidate genes for mosaic resistance by cDNA-AFLP technique using two contrasting varieties for SCMV (Rib-1 strain) resistance. Plants of the varieties IACSP95-5000 (resistant) and IAC91-1099 (susceptible) obtained by micro-meristem were inoculated with the Rib-1 strain under greenhouse controlled conditions to the identification of differentially expressed fragments (DEF) at the sampling time points of 24, 48 and 72 hours after inoculation (hpi). In total, 772 DEFs were obtained, of which 392 were observed in the resistant variety and 380 in the susceptible. The varieties showed differential behavior in the number of induced and repressed DEFs during the sampling time points (24, 48 and 72 hpi). The resistant variety produced a higher number of DEFs at 24 hpi (probably corresponding to induced genes) decreasing over the time of inoculation, when compared to the susceptible, in which the number of DEFs increased over the hpi. Sixty-six DEFs were identified exclusively in the resistant variety, of which 9 were repressed and 57 induced after inoculation with SCMV. Of these 57, 23 were sequenced and 10 of them showed identity with known plant sequences, mostly related to mechanisms of plant defense against pathogen, while 3 DEFs have no identities with sequences described in the bank and probably may play an important role in the resistance mechanism. The cDNA-AFLP technique was effective in revealing changes in the transcription profile within and between contrasting varieties when challenged by the mosaic virus. The total set of DEFs can be an important tool in studies to understand the resistance mechanism, as well as for the development of molecular markers to be applied in genetic mapping for sugarcane mosaic resistance.

Keywords: *Potyvirus*, differential expression, *Saccharum spp.*, SCMV

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a cana-de-açúcar é uma das culturas de maior importância econômica, servindo como matéria-prima para a produção do açúcar, álcool e biomassa, além de muitos outros subprodutos que também possuem valor comercial (FELIX, 2006; BRANCO, 2008).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana e ocupa posição de destaque, sendo, também, o maior produtor mundial de açúcar e álcool, abastecendo os mercados interno e externo (UNICA, 2013; CONAB, 2013).

Alguns fatores são limitantes para a produção dessa cultura, como por exemplo, a incidência de doenças causadas por vírus, fungos e bactérias. Dentre as doenças causadas por vírus, o mosaico apresenta maior incidência na cultura, sendo caracterizada como doença de grande potencial, tendo em vista que diversas epidemias já ocorreram no Brasil.

O controle do mosaico é realizado pela técnica de *roguing* em viveiros, a qual consiste na eliminação de plantas com sintomas da doença e, principalmente, pelo uso de variedades resistentes. Por essa razão, os programas de melhoramento visam à seleção de clones resistentes e tolerantes a esta doença.

Diversas estratégias que utilizam ferramentas moleculares estão disponíveis para a identificação de genes de interesse para serem utilizados no desenvolvimento de novas variedades pelos programas de melhoramento. A técnica de cDNA-AFLP (BACHEM et al., 1998) desenvolvida a partir da técnica de AFLP (VOS et al., 1995) permite acessar o polimorfismo ao nível transcricional, visto que utiliza o cDNA (DNA complementar) ao invés do DNA genômico na etapa de digestão com enzimas de restrição. Esta técnica apresenta como principal vantagem não necessitar de conhecimento prévio da sequência e, dessa forma, é útil para a descoberta de genes (MILIONI et al., 2002; BACHEM et al., 1996).

O cDNA-AFLP tem sido utilizado na detecção de polimorfismos genéticos entre fenótipos contrastantes sob condições controladas (LAO et al., 2008; QUE et al., 2009). Tais polimorfismos podem ser utilizados na identificação de genes candidatos e no desenvolvimento de marcadores para mapeamento genético. Segundo Butterfield et al. (2004) fragmentos diferencialmente expressos de cDNA identificados durante o estresse biótico tem grande potencial, em cana-de-açúcar,

como marcadores genéticos para resistência a pragas e doenças. Em cana-de-açúcar, a técnica de cDNA-AFLP foi utilizada com sucesso em estudo de resistência a cigarrinha (GUIMARÃES, 2007) e doenças de importância como ferrugem marrom (CARMONA et al., 2004) e carvão (THOKOANE; RUTHERFORD, 2001, LAO et al., 2008).

Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo a verificação de genes diferencialmente expressos em dois cultivares de cana-de-açúcar contrastantes quanto à resistência ao vírus do mosaico. A caracterização desses fragmentos pode permitir a construção de marcadores moleculares possibilitando assim a seleção assistida em programas de melhoramento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence à tribo *Andropogoneae*, família *Poaceae*. Essa família, também conhecida como família das gramíneas, é de grande importância por incluir cereais como o milho, trigo, arroz e sorgo, bem como muitas culturas forrageiras (PALHARES, 2010).

O gênero *Saccharum* compreende seis espécies, *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. edule*, *S. barberi*, e *S. sinense* (D'HONT et al., 1998), sendo que a cana-de-açúcar cultivada é um híbrido multiespecífico e recebe a designação *Saccharum* spp (TOPPA et al., 2010). A cana-de-açúcar tem sido cultivada a mais de 4000 anos e acredita-se que o local de sua origem seja as regiões da Nova Guiné e Indonésia (BORRÁS-HIDALGO et al., 2005).

Na safra 2012/2013, o Brasil moeu 590 milhões de toneladas de cana resultando na produção de pouco mais de 38 milhões de toneladas de açúcar e 23,3 milhões de m³ de álcool. Cerca de dois terços do açúcar produzido no País, aproximadamente 27 milhões de toneladas, teve como destino o mercado internacional. Já o açúcar bruto respondeu por cerca de 80% das vendas no mercado externo (USINA SÃO MARTINHO, 2013).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de cana do mundo e também o maior produtor e exportador mundial de açúcar e etanol (MAPA, 2013). A lavoura de cana-de-açúcar no Brasil continua em crescente expansão devido ao crescimento do mercado consumidor interno e externo e a implantação de novas usinas sulcroalcooleiras (CONAB, 2013).

2.2 Vírus do mosaico da cana-de-açúcar (SCMV)

A família *Potyviridae* é composta por sete gêneros: *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus* e *Brambyvirus* (KING et al., 2012) e, dentre as famílias de vírus que infectam plantas, é uma das maiores e

economicamente mais importantes, contendo cerca de 16% das espécies descritas (FAUQUET et al., 2005).

Os membros dessa família infectam mais de 2.000 espécies de planta e são encontrados em todo o mundo. Os *Potyviridae* podem ser facilmente transmitidos experimentalmente para plantas saudáveis, por meio da inoculação com extrato vegetal infectado ou utilizando preparações virais purificados ou concentrados e induzem a formação de inclusões cilíndricas no citoplasma de células infectadas, também denominadas “cata-ventos”, sendo esta uma característica relevante para a identificação de espécies pertencentes à família (BERGER et al., 2005).

O gênero *Potyvirus* é o mais numeroso da família, com mais de 140 espécies descritas (KING, et al., 2012) que causam grandes danos econômicos em diversas culturas a medida que infectam, em diferentes regiões climáticas, uma gama extensa de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (URCUQUI-INCHIMA et al., 2000, FAUQUET et al., 2005; DIPIERO et al., 2006).

No Brasil, entre as principais viroses incidentes na cultura da cana-de-açúcar está o mosaico, historicamente e potencialmente uma das doenças mais importantes dessa cultura (GONÇALVES et al., 2007). O mosaico pode ser causado por um subgrupo de sete espécies distintas de *Potyvirus* que infectam diferentes poáceas: *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), espécie que dá nome ao complexo viral do SCMV; *Sorghum mosaic virus* (SrMV); *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV); *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV), (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994); *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV); *Pennisetum mosaic virus* (PenMV) e *Zea mosaic virus* (ZeMV) (GONÇALVES et al., 2012).

O mosaico da cana-de-açúcar ocorre em mais de 70 países, sendo que apenas o SCMV, o SrMV e o SCSMV podem infectar esta cultura em condições naturais (ALEGRIA et al., 2003, GONÇALVES et al., 2012), porém, no Brasil, apenas a espécie SCMV é encontrada infectando naturalmente cana-de-açúcar (GONÇALVES et al., 2004).

O vírus do mosaico é transmitido por diferentes espécies de afídeos, dentre as quais *Rhopalosiphum maidis* e *Schizaphis graminum* são comumente encontradas em outras culturas como milho e sorgo (TEAKLE; SHUKLA; FORD, 1989), como se evidencia no Brasil. A transmissão é do tipo não persistente e os

períodos de acesso de aquisição e transmissão duram de poucos segundos a minutos. No entanto, o período de retenção pode durar até algumas horas, como no caso do SCMV-MDB (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994).

Os sintomas iniciais de infecção consistem em pontos cloróticos com distribuição linear no meio ou mais comumente na base das folhas, que evoluem para áreas alongadas formando um mosaico típico, o qual pode aumentar de severidade com a idade da folha (GONÇALVES et al., 2007). Ainda segundo o mesmo autor, o crescimento das plantas pode ser acentuadamente reduzido, conforme a espécie e estirpe do vírus e a variedade de cana, principalmente quando a infecção ocorre nos estágios iniciais de desenvolvimento. Ocasionalmente em variedades muito suscetíveis, podem ocorrer riscas e estrias nos colmos e encurtamento dos entrenós.

O vírus do mosaico ataca outras gramíneas como milho, *Zea mays* (COSTA; KITAJIMA; ARRUDA, 1971) e o sorgo, *Sorghum bicolor* (PINTO, 1984). Dessa forma, com o grande aumento da área plantada de milho e sorgo no país nos últimos anos, associado ao cultivo do milho na safrinha têm prolongado a permanência da cultura no campo contribuindo para a maior incidência do mosaico e a manutenção da fonte de inóculo (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997). Em consequência, amplia-se a possibilidade de que novas estirpes do SCMV estejam se disseminando no campo (GONÇALVES et al., 2007).

Atualmente, a doença está relativamente controlada no país com o uso de variedades resistentes, porém, frequentemente observam-se plantas sintomáticas em plantios comerciais, durante a avaliação de novos clones de cana-de-açúcar visando o melhoramento genético e, ocasionalmente, em viveiros de mudas e plantios comerciais (GONÇALVES et al., 2007).

2.3 A técnica de cDNA-AFLP

Uma variedade de técnicas moleculares está disponível para a identificação e clonagem de genes diferencialmente expressos, incluindo *differential display* e *RNA-fingerprinting*. Entretanto, esses métodos apresentam limitações tais como reprodutibilidade, dificuldade em expressar mensagens muito raras e geração de

falsos positivos. Essas limitações surgem primeiramente devido ao uso de “primers” com oligonucleotídeos arbitrários e pela necessidade de temperaturas de anelamento relativamente baixas para obter os produtos de amplificação (BACHEM; OOMEN; VISSER, 1998). De acordo com o mesmo autor a técnica de cDNA-AFLP supera amplamente tais limitações e possibilita uma simples e rápida verificação da identidade da banda. Além disso, permite a avaliação sistemática de quase todos os transcritos em um dado sistema biológico utilizando pequenas quantidades de material inicial (MERTZ; HENNING; ZIMMER, 2009).

O cDNA-AFLP é baseado na técnica de AFLP descrita por Vos et al. (1995), mas com a utilização de cDNA, ao invés do DNA. O cDNA é sintetizado por meio da enzima transcriptase reversa que tem a capacidade de produzir uma molécula de DNA fita dupla a partir da cópia de um RNA mensageiro. A sua metodologia inclui a digestão do cDNA por duas enzimas de restrição e ligação de adaptadores específicos, onde os “primers” seletivos se ligam, permitindo a amplificação simultânea dos fragmentos (BACHEM; OOMEN; VISSER, 1998) (Figura 01).

Os fragmentos de cDNAs gerados são separados por meio de eletroforese em seqüenciador automático de DNA, ou através de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata para a visualização das bandas, sendo esta última análise mais vantajosa, pois permite a recuperação dos fragmentos derivados de transcritos, a partir do gel de poliacrilamida reidratado e, posteriormente, esses fragmentos são eluídos em tubos de PCR contendo água ou tampão (BLEARS et al., 1998).

A tecnologia do cDNA-AFLP apresenta elevado nível de reprodutibilidade e gera um grande número de fragmentos diferencialmente expressos, amplificando fragmentos de 100 a 1000 pb, que são visualizados em gel de poliacrilamida, de alta resolução (BREYNE et al., 2003). Além disso, a principal vantagem desta técnica é o fato de que ela não necessita de prévio conhecimento da seqüência e, dessa forma, é útil para a descoberta de genes ainda desconhecidos (BACHEM et al., 1996, MILIONI et al., 2002).

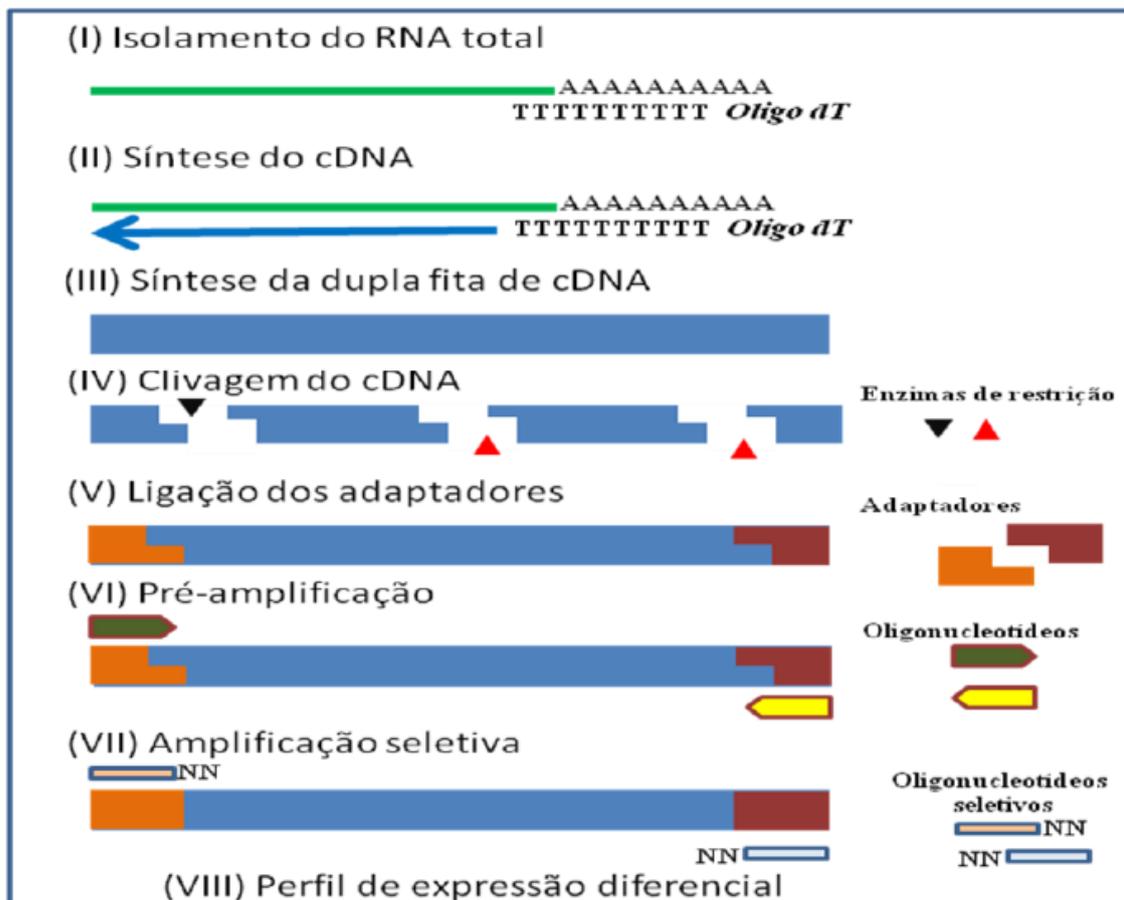


Figura 01. Esquema da metodologia de cDNA-AFLP. Baseado na figura de Bachem, Oomen e Visser (1998) (LOPES, 2013).

Vários estudos foram realizados utilizando a técnica de cDNA-AFLP, sendo que a primeira aplicação desta técnica foi descrita por BACHEM et al. (1996) em que foi analisado a expressão diferencial em batata durante a formação do tubérculo. Nesse estudo, foram encontrados dois fragmentos de cDNA codificantes para a enzima lipoxigenase.

Campalans, Pagès e Messeguer (2001) identificaram, através da técnica de cDNA-AFLP, fragmentos diferencialmente expressos em amendoieira (*Prunus Amygdalus* (L.) Batsch) submetida ao estresse hídrico. Dentre aqueles relacionados ao mecanismo de tolerância à seca, foram encontrados fragmentos que codificavam proteínas tais como um transportador de compostos nitrogenados, a 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferase, uma proteína de choque térmico de baixo peso

molecular, uma cisteína proteinase e uma proteína rica em prolina expressa constitutivamente.

Em relação à aplicação da técnica de cDNA-AFLP em estudos de resistência a doenças, ECKEY et al. (2004) identificaram, em cevada (*Hordeum vulgare* L.) genes envolvidos nos eventos iniciais de resistência ao fungo *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Determinados fragmentos derivados dos transcritos na variedade resistente apresentaram homologia com MAP quinases, fatores de transcrição e receptores com domínio quinase. A análise funcional de uma MAP quinase foi realizada através do nocaute do gene codificante levando à suscetibilidade plantas de cevada antes consideradas resistentes ao fungo.

Em cana-de-açúcar, a técnica de cDNA-AFLP tem sido utilizada tanto em estudos de resistência a doenças como de pragas de importância à cultura. Thokoane e Rutherford (2001) utilizaram a técnica de cDNA-AFLP para análise da expressão diferencial de genes induzidos em cana-de-açúcar após a planta ser desafiada pelo fungo patogênico *Ustilago Scitaminea*.

Carmona et al. (2004) utilizando a técnica de cDNA-AFLP identificou genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar durante a interação com *Puccinia melanocephala*. Esses genes foram relacionados com proteínas de reconhecimento resposta de sinalização.

A técnica de cDNA-AFLP foi utilizada por Borrás-Hidalgo et al. (2005) para identificar genes diferencialmente expressos em somaclones resistentes de cana-de-açúcar em resposta à inoculação com *Ustilago scitaminea* ou *Bipolaris sacchari*, agentes causais da ferrugem e mancha ocular, respectivamente, e a maioria dos genes encontrados foram relacionados com a defesa ou a sinalização às doenças.

Ainda em relação à infecção por *Ustilago scitaminea*, Que et al. (2011) também realizaram em cana-de-açúcar um estudo da expressão gênica diferencial por cDNA-AFLP em resposta ao desafio pelo fungo patogênico e identificaram 28 fragmentos diferencialmente expressos em uma variedade resistente ao fungo que foram diretamente relacionados ao ataque do patógeno.

Guimarães (2007), através da técnica de cDNA-AFLP, identificaram dois fragmentos expressos somente na variedade de cana-de-açúcar resistente a

Mahanarva fimbriolata e ausente na suscetível ao ataque da cigarrinha, os quais, possivelmente estão ligados a um mecanismo de antibiose da planta.

Após a inoculação com *Sporisorium scitamineum*, Lao et al. (2008), encontraram um total de 64 fragmentos derivados de transcritos diferencialmente expressos em uma variedade resistente de *Saccharum* spp. nas primeiras 72 horas após a inoculação. Os genes encontrados foram relacionados à resposta da planta contra o patógeno tais como, genes envolvidos no metabolismo oxidativo, resposta defensiva, vias do etileno e auxinas.

A técnica de cDNA-AFLP também têm sido utilizada para uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência das plantas aos vírus (CHENG et al., 2010; CHEN et al., 2012; LIN, et al., 2013). Para estudar a expressão gênica diferencial em *Cucumis metuliferus* em resposta à infecção por *Papaya ringspot vírus* (PRSV) Lin et al. (2013) identificaram um total de 28 genes candidatos para resistência ao vírus sendo que dois destes foram notáveis, uma vez que suas sequências foram homólogas a uma proteína inibidora de protease e a uma proteína de resistência contendo o domínio NBS-LRR.

Chen et al. (2012) utilizando a mesma técnica encontraram 42 fragmentos diferencialmente expressos em tabaco infectado com *Tobacco mosaic virus* (TMV). Dentre esses, o fragmento designado NtGRP foi identificado como um provável gene de resistência ao TMV.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Duas variedades, uma resistente (IACSP95-5000) e outra suscetível (IAC91-1099) à estirpe Rib-1 do vírus do mosaico da cana-de-açúcar (SCMV) foram obtidas por cultura de meristemas, a fim de garantir a sanidade do material, na biofábrica do Centro de Cana (Ribeirão Preto, São Paulo) do Instituto Agronômico de Campinas. Estas duas variedades foram desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento de Cana-de-Açúcar do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

3.2 Condução do experimento

Inicialmente, as plântulas enraizadas provenientes da cultura de tecidos foram retiradas dos frascos (*in vitro*) e passadas para copos plásticos de 200 mL, contendo substrato comercial e adubação recomendada para o estabelecimento de mudas. As mudas foram mantida em casa de vegetação revestida com tela de proteção anti-afídeos, situada no Centro de Cana do Instituto Agronômico de Campinas, no município de Ribeirão Preto – SP. Após 20 dias (período de aclimação das mudas), as mesmas foram individualizadas e transplantadas em vasos com capacidade para um litro, contendo também substrato e adubação adequada.

O experimento foi conduzido utilizando 6 plantas de cada variedade e seus respectivos controles (plantas não inoculadas) para cada um dos tempos de amostragem (0, 24, 48 e 72 horas após a inoculação - hpi) adotando-se o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em casa de vegetação (Figura 02).

A escolha do local para a disposição dos vasos em casa de vegetação foi estratégica, a fim de padronizar condições de luminosidade, sombreamento irrigação e temperatura para cada vaso. O experimento ocorreu nos meses de janeiro a março de 2012 e foi adotado o sistema de rega automático, realizado duas vezes ao dia por 15 minutos.

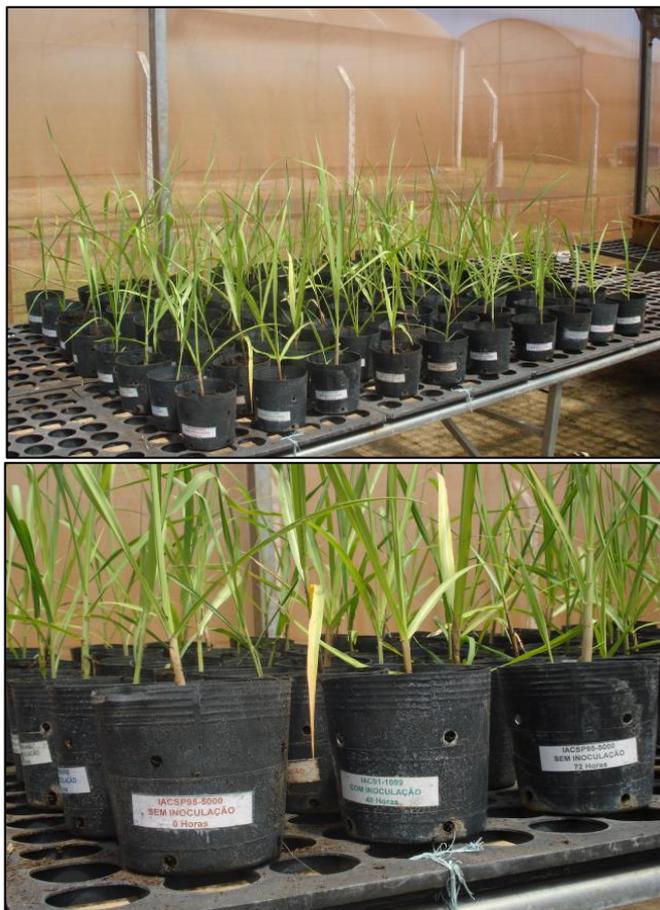


Figura 02. Ensaio em casa de vegetação: 6 repetições biológicas para cada variedade (resistente e suscetível) em cada um dos 4 tempos de amostragem (0, 24, 48 e 72 horas após inoculação - hpi) e respectivos controles não inoculados, em delineamento inteiramente casualizado.

3.3 Inoculação com o SCMV – estirpe Rib-1

Plantas de sorgo “Rio” foram inoculadas com a estirpe Rib-1 do SCMV (GONÇALVES et al., 2007) para servir como fonte de inóculo viral para o experimento. As mudas das variedades resistente e suscetível foram inoculadas mecanicamente com o vírus aos 35 dias do plantio (15 dias após o transplante nos vasos de 1 litro). Para isso, folhas jovens de sorgo “Rio”, previamente inoculadas com a estirpe Rib-1 e apresentando sintomas típicos de mosaico, foram maceradas em nitrogênio líquido, adicionando-se ao macerado a proporção de 1:10 (tecido foliar/tampão) de tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2, com 0,1% de sulfito de sódio.

Ao extrato obtido foi adicionado o abrasivo foliar carbeto de silício (carborundum) para provocar microferimentos na epiderme foliar da cana-de-açúcar, permitindo a entrada do vírus. O inóculo foi espalhado nas folhas das plantas exercendo uma leve pressão. Nas plantas utilizadas como controles negativos, foi espalhado somente o tampão de extração misturado ao abrasivo foliar (Figura 03). Após o inóculo ser espalhado nas folhas, procedeu-se a uma leve lavagem das mesmas com água destilada para retirada do excesso de extrato.

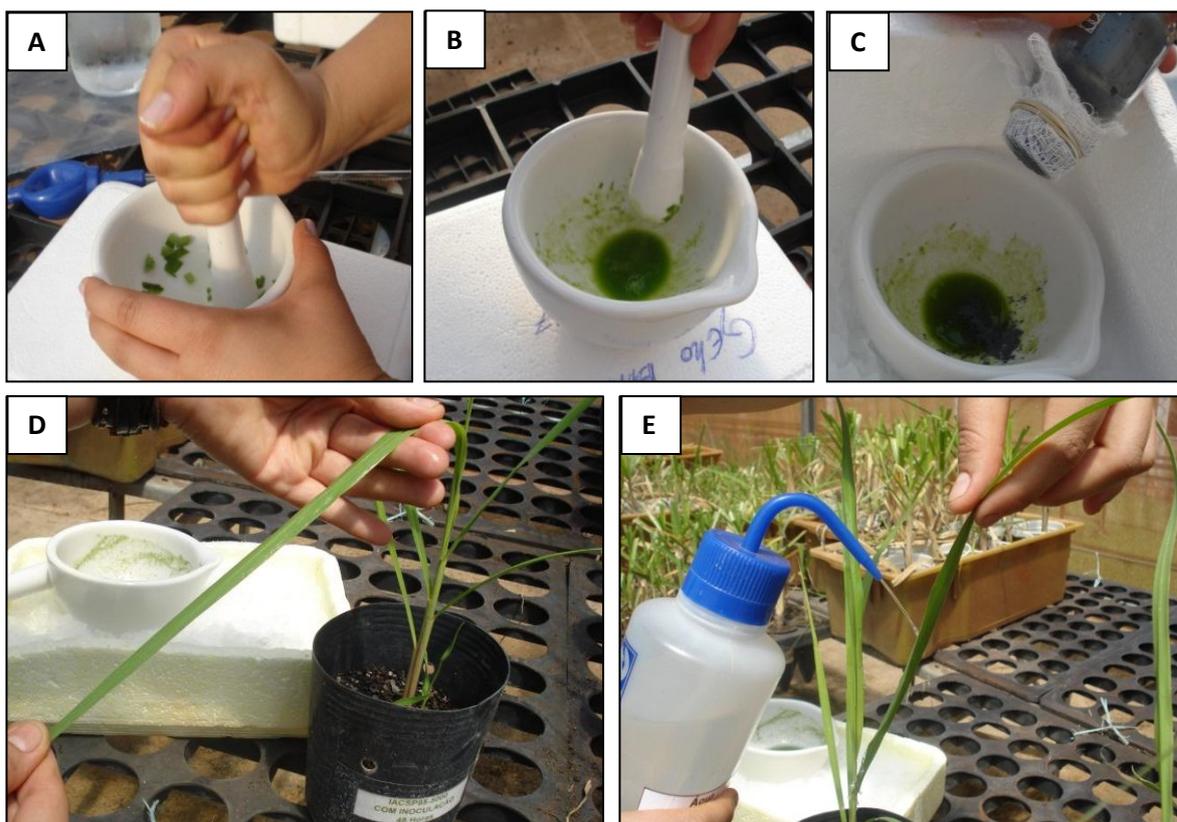


Figura 03. Inoculação das plantas do ensaio com extrato contendo o vírus do mosaico da cana (SCMV estirpe Rib-1). A: Folhas de sorgo infectado maceradas com tampão fosfato de sódio 0,01M; B: Extrato infectado obtido após maceração; C: Adição de carborundum ao extrato; D: Distribuição do extrato nas folhas das plantas; E: Lavagem das folhas inoculadas com água destilada.

3.4 Coleta do tecido vegetal

Para cada variedade, em cada um dos tratamentos (tempos de coleta), a folha +1 foi coletada individualmente das seis repetições biológicas (plantas)

inoculadas e não inoculadas (controle). Para as plantas correspondentes ao tratamento 0 horas o tecido vegetal foi coletado antes de qualquer inoculação (este tempo de coleta foi incluído para permitir uma posterior validação dos fragmentos diferencialmente expressos, FDEs por PCR em tempo real - *Real time PCR*).

As folhas foram guardadas em papel alumínio, devidamente identificados e mergulhadas em nitrogênio líquido. Ao final da coleta, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C onde permaneceram até o momento da extração do RNA.

3.5 Extração do RNA total

Antes de iniciar a extração do RNA total, todos os utensílios utilizados, como almofariz, pistilo e espátulas, foram mantidos a 180°C por 3 h, impedindo assim a ação de RNAses.

O RNA total foi extraído individualmente de folhas de três plantas de cada repetição biológica, bem como das plantas utilizadas como controle, com o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, os RNAs foram digeridos com DNase, para a remoção de qualquer contaminação com DNA genômico que pudesse existir na amostra.

Para verificar a presença de DNA genômico nas amostras de RNA foi realizada uma PCR (Reação em cadeia da polimerase) com um par de “primers” do gene endógeno gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH).

3.6 Quantificação e integridade dos RNAs

A quantificação do RNA total de todas as amostras foi aferida utilizando-se o equipamento NanoDrop ND-2000c (Thermo Scientific), para isso foram necessários 1 μl de cada amostra. A avaliação da pureza das amostras foi baseada nas razões de absorvância 260/280 nm e 260/230 nm. A integridade foi comprovada pela corrida em gel de agarose 1,5%.

3.7 Comprovação da presença do vírus por diagnóstico molecular (RT-PCR)

Para confirmar a presença do SCMV, foi realizado o teste de RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) para o SCMV utilizando o RNA total extraído, de acordo com GONÇALVES et al. (2007). A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada com a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA) aplicando-se 2 µg do RNA total previamente incubado com um oligo (dT) de 17 nucleotídeos a 70°C por 5 minutos.

Para a reação de PCR, foi utilizado o oligonucleotídeo senso SCMVF4 (ALEGRIA et al., 2003) e o oligonucleotídeo anti-senso SCMVR3 (YANG; MIRKOV, 1997) que amplificam regiões do genoma correspondentes à capa protéica (CP) das espécies do SCMV. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, preparado em tampão TAE, pH 8,0, corado com brometo de etídeo e observado sob luz UV.

3.8 Síntese do cDNA de dupla-fita

A síntese do cDNA foi feita, para cada tempo de amostragem e variedade, a partir de uma mistura (*bulk*) de quantidades equitativas de RNA total extraído individualmente de três das seis réplicas biológicas. A síntese da primeira fita de cDNA foi feita a partir de 5,0 µg de RNA total, utilizando o conjunto de reagentes *Revertaid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis* “kit” (Fermentas, Lituânia) e a segunda fita foi sintetizada conforme as orientações do mesmo fabricante. Após a síntese da segunda fita, o cDNA foi purificado pelo método fenol-clorofórmio.

3.9 A técnica de cDNA – AFLP

Após a obtenção do cDNA de fita dupla, os marcadores do tipo AFLP foram obtidos de acordo com o protocolo estabelecido por VOS et al., (1995), com modificações para cDNA. Para isso os cDNAs de fita dupla purificados foram quantificados e diluídos a 25 ng/µl. Foram avaliados os polimorfismos gerados pela

combinação de enzimas *EcoRI* e *MseI* assim como para a combinação *EcoRI* e *MspI*.

3.9.1 Digestão dos cDNAs

As reações foram conduzidas em um volume de 20 μL contendo 250 ng de cDNA de fita dupla, tampão OPA (*One for all*) 10X e 2,5 unidades de cada enzima (digestão dupla). As reações foram incubadas por 3 horas a 37°C e, posteriormente, a 65°C por 5 minutos para inativação da atividade enzimática em termociclador (BioRad, MyCycler).

3.9.2 Ligação de adaptadores

A ligação dos adaptadores foi conduzida em um volume final de reação de 40 μL , contendo 20 μL da reação de digestão, 8 μL de tampão 5 X, 4 μM do adaptador para *EcoRI* (a 5 pmol) e 40 μM do adaptador para *MseI* ou *MspI* (a 50 pmol), 0,5 mM de ATP e 33,5 U (weiss unit) de T4 DNA ligase (*Biolabs*). A reação de ligação dos adaptadores foi conduzida em termociclador à temperatura de 37°C por duas horas seguida de 16 horas a 16°C.

3.9.3 Pré-amplificação

Os produtos provenientes da reação de ligação dos adaptadores foram diluídos 6 vezes (6X) em água miliQ. A reação de pré-amplificação foi conduzida em um volume final de 15 μL , contendo tampão 10X (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 0,5 mM de MgCl_2 , 0,16 mM de dNTPs e 3,3 μM de “primer” *Eco*+0 (uma base seletiva) e 3,3 μM de “primer” *MseI*+0 ou *MspI*+0 e 0,1U de Taq polimerase.

As reações foram conduzidas em termociclador de acordo com ciclagem a seguir:

Início	29 ciclos			Término
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	
72°C 2 Minutos	94°C 30 Segundos	56°C 1 Minuto	72°C 1 Minuto	15°C infinito

3.9.4 Amplificação seletiva

A reação de amplificação seletiva foi conduzida em um volume final de 15 µl contendo tampão 10X (200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl), 0,25mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 1,3 µM de cada “primer” seletivo *EcoRI* e *MseI* ou *MspI*, 0,2 U de taq polimerase e 2µl da diluição 10x da reação de pré-amplificação. As condições de amplificação foram: 13 ciclos a 94°C por 30 segundos, 65°C (-0,7 °C/ ciclo) por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguidos por 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto.

Para os fragmentos gerados a partir da digestão com as enzimas *EcoRI* e *MseI* foram avaliados 9 combinações de “primers” com três bases seletivas enquanto para aqueles obtidos pela digestão com as enzimas *EcoRI* e *MspI* foram utilizados 7 combinações de “primers” seletivos (Tabela 1).

Tabela 1. Combinações de “primers” seletivos utilizados na técnica de cDNA-AFLP.

Combinações de “primers” <i>EcoRI/MseI</i>	Combinações de “primers” <i>EcoRI/MseI</i>
E-ACA/ M ₁ CTT	E-AAC/ M ₂ ACT
E-AAA/ M ₁ CTT	E-AAC/ M ₂ TCG
E-ACT/ M ₁ CTA	E-ACG/ M ₂ ACT
E-ACC/ M ₁ CTT	E-AAC/ M ₂ GAA
E-AAG/ M ₁ CTT	E-AAC/ M ₂ ACA
E-ACT/ M ₁ CTT	E-ACG/ M ₂ TTG
E-ACT/ M ₁ CAA	E-ACG/ M ₂ ACA
E-AAC/ M ₁ CGT	
E-AAG/ M ₁ CGT	

E- *EcoRI*; M₁- *MseI*; M₂-*MspI*

3.9.5 Separação dos fragmentos de cDNA-AFLP

Os produtos amplificados foram separados através da eletroforese vertical em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% em tampão de corrida TBE (445 mM de Tris-base; 445 mM de ácido bórico; 10 mM de EDTA) pH 8,0. Aos produtos amplificados foram adicionados 7 µl de tampão formamida a 98% (v/v) contendo 10 mM EDTA, 0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 0,025% (p/v) de xileno cianol (2:1). Após desnaturação à 90°C por 4 minutos as amostras foram aplicadas no gel.

Para uma melhor identificação dos fragmentos diferencialmente expressos (FDEs) no gel, cada amostra, correspondente aos diferentes tempos de amostragem, bem como o seu controle foram aplicados duas vezes em cada poço do gel.

Após a corrida por 2 horas a 55 W, os fragmentos foram revelados pela coloração com prata segundo protocolo descrito por Creste, Tulmann-Neto e Figueira (2001).

3.10 Detecção, Recuperação e Reamplificação dos FDE

Os FDEs amplificados foram detectados a partir da visualização dos géis, com o auxílio de um transluminador de luz branca. Após a detecção dos FDEs foi realizada a excisão, a partir do gel reidratado *overnight* em água destilada, e o tamanho molecular foi estimado de acordo com as distâncias percorridas no gel em relação aos padrões de tamanho molecular, em pares de bases (pb).

Os fragmentos retirados do gel foram eluídos em 50 µL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl e 1,0 mM de EDTA, pH 8,0) e incubados *overnight* a 4°C. Em seguida, foram aquecidos a 60°C por 2 h, sendo, em seguida, submetidos a 3 ciclos de congelamento e descongelamento com posterior centrifugação rápida, de acordo com o protocolo descrito por PATHAN et al. (2007).

Os FDEs foram reamplificados, utilizando as mesmas combinações de “primers” seletivos que os deram origem e as mesmas condições de ciclagem

realizadas na reação de amplificação seletiva. Os produtos de PCR da reação de reamplificação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

3.11 Purificação, clonagem e sequenciamento dos FDEs

Os FDEs foram purificados dos pedaços dos géis de agarose contendo a banda de interesse, utilizando o Wizard® SV Gel and PCR Clean up system “kit” (Promega, Alemanha). Em seguida, os FDEs foram quantificados em espectrofotômetro e ligados ao vetor de clonagem pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, Alemanha) na razão de 3:1 (inserto: vetor) e incubados *overnight* a 4°C. O volume de 10,0 µL da reação de ligação foi adicionado a um tubo contendo 100 µL de células de *Escherichia coli* (cepa DH10B) quimicamente competentes, e mantidos a 4°C por aproximadamente 1 hora. As bactérias foram transformadas por choque térmico em banho-maria a 42°C por 1 minuto e retornadas ao gelo. As células foram transferidas para 1,0 mL de meio de cultura LB (Luria Bertani) e incubadas a 37°C por 1 h sob agitação a 80 rpm. A seguir, as células de *E. coli* foram espalhadas em placas de cultura contendo meio LB sólido, antibiótico ampicilina (50 µg/mL) e X-gal 2% e mantidas em estufa a 37°C *overnight* para crescimento das colônias.

As colônias transformantes (cor branca) foram transferidas, com o auxílio de palitos de madeira autoclavados, para uma nova placa de cultura contendo meio LB sólido e antibiótico ampicilina. Para cada placa, foram transferidos quatro clones, a fim de garantir a eficiência da transformação com o inserto de interesse.

As colônias transformantes remanescentes nos palitos de madeira foram transferidas para um mix de reação de PCR com os “primers” SP6 e T7 do vetor de clonagem, a fim de verificar se os plasmídeos continham os insertos de tamanhos correspondentes aos estimados anteriormente.

Após a verificação dos produtos da PCR, as colônias presentes na placa contendo meio sólido e antibiótico e que foram utilizadas para a reação de amplificação, foram transferidas com o auxílio de um palito de madeira para 3 mL de meio líquido e incubadas a 37°C por uma hora. Em seguida, um volume 750 µL das células foi transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo 250 µL de glicerol e armazenados em freezer -20°C e o restante foi utilizado para a preparação do DNA

plasmidial a ser sequenciado, de acordo com o Kit *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega, Alemanha).

O sequenciamento dos FDEs após a clonagem foi realizado através do método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems - PE, Inc., CA, USA). A reação de sequenciamento foi montada em microplacas utilizando os “primers” T7 e SP6 do plasmídeo.

Após a reação de sequenciamento, os produtos da amplificação foram precipitados pela adição de 45 µL de isopropanol 75% e centrifugação por 30 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada em posição invertida a 1000 rpm por 1 minuto para a eliminação do isopropanol residual.

Ao precipitado de DNA foi novamente adicionado 100 µL de isopropanol e o sobrenadante foi descartado através da inversão da placa, seguido da centrifugação por 1 minuto da placa em posição invertida. Após a secagem em estufa a 37°C por 30 minutos as amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida e incubadas por 5 minutos a 95 °C para desnaturação. Em seguida, as amostras foram submetidas ao sequenciamento automático no sequenciador *Genetic Analyzer ABI/Hitachi 3500* (Applied Biosystems, Foster City, California CA).

3.12 Análise das sequências

As análises das sequências foram realizadas por meio do algoritmo BlastX (ferramenta BLAST do NCBI) para verificar a similaridade com sequências já descritas em banco de dados públicos de proteínas. Foi adotado como limite inferior do e-value, o valor de 1e-5, para análise das similaridades. As sequências dos FDEs que apresentaram baixa ou nenhuma similaridade com as depositadas no banco de proteínas foram pesquisadas por meio dos algoritmos BlastN e tBlastX contra o banco de dados públicos não redundantes de nucleotídeos. Os fragmentos que apresentaram similaridade com proteínas hipotéticas, tiveram suas sequências consultadas no banco de dados de proteínas (UniProtKB) para verificar as anotações de funções biológicas no *Gene Ontology* (GO).

4 RESULTADOS

4.1 Observação dos sintomas em casa de vegetação após a inoculação com o SCMV Rib-1

Um mês após a inoculação com o SCMV, as plantas correspondentes à variedade suscetível (IAC91-1099 com inoculação) apresentaram sintomas típicos da doença, tais como folhas com áreas verdes claras (mosaico), redução de porte e encurtamento dos entrenós. Já nas plantas correspondentes à variedade resistente (IACSP95-5000) não foi observado quaisquer sintomas da doença e seu crescimento não foi prejudicado (Figura 04 e Figura 05).

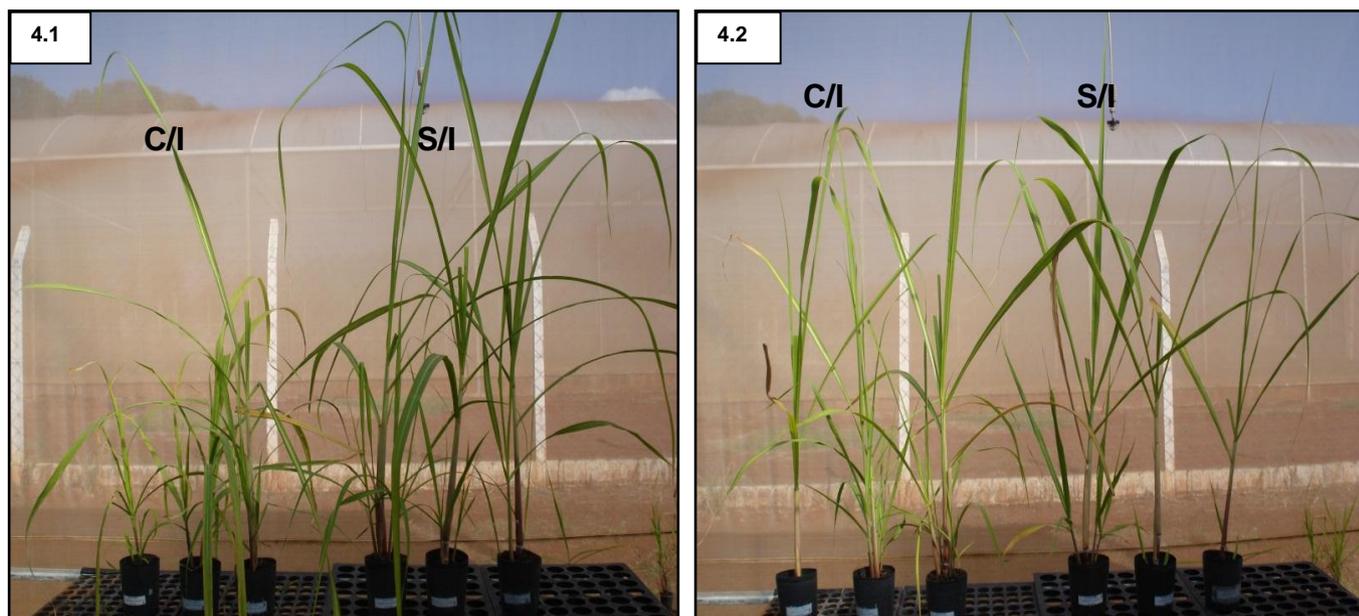


Figura 04. - 4.1 Plantas da variedade IAC91-1099 com sintomas típicos de mosaico e elevada redução do porte (C/I), quando comparadas ao seu controle (S/I), após inoculação com o SCMV (RIB-1). 4.2 Plantas correspondentes à variedade IACSP95-5000 inoculadas (C/I) e não inoculadas (S/I) com o SCMV (RIB-1).

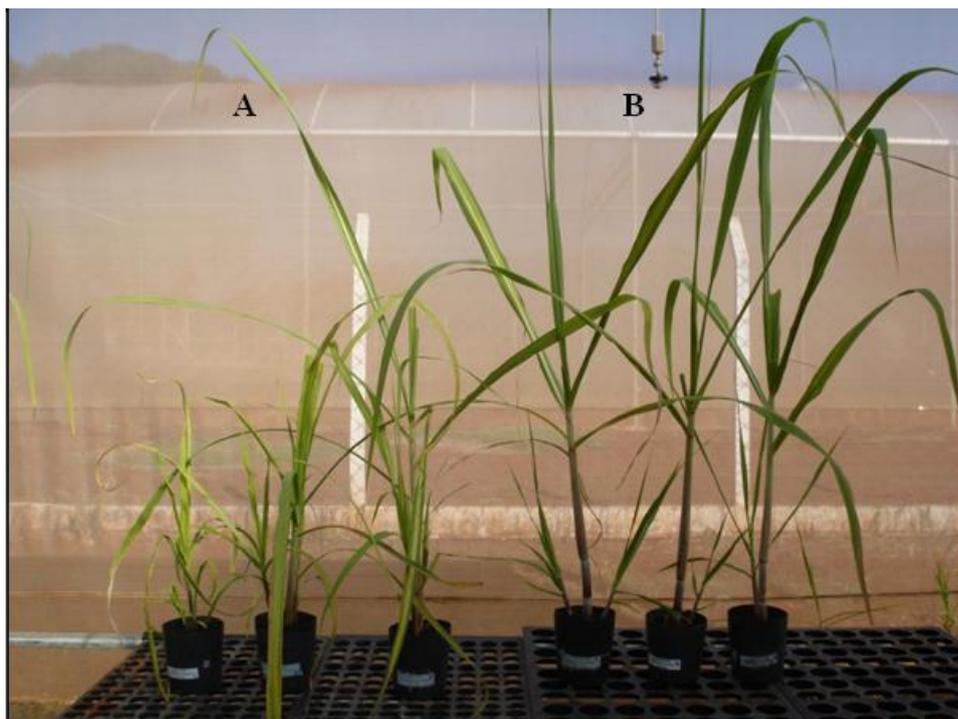


Figura 05. (A) Plantas correspondentes à variedade IAC91-1099 após inoculação com SCMV apresentando sintomas típicos da doença. B) Plantas correspondentes à variedade resistente (IACSP95-5000) ao SCMV, após inoculação.

4.2 Quantificação e Integridade dos RNAs

Após a extração do RNA total, foi realizada a quantificação dos mesmos em espectrofotômetro. As amostras apresentaram valores entre 1054,0 ng/ μ L e 4700,0 ng/ μ L. A integridade foi comprovada pela corrida em gel de agarose 1,5% verificando as bandas dos RNAs ribossomais 18S e 28S, que se apresentaram íntegros (Figura 06).

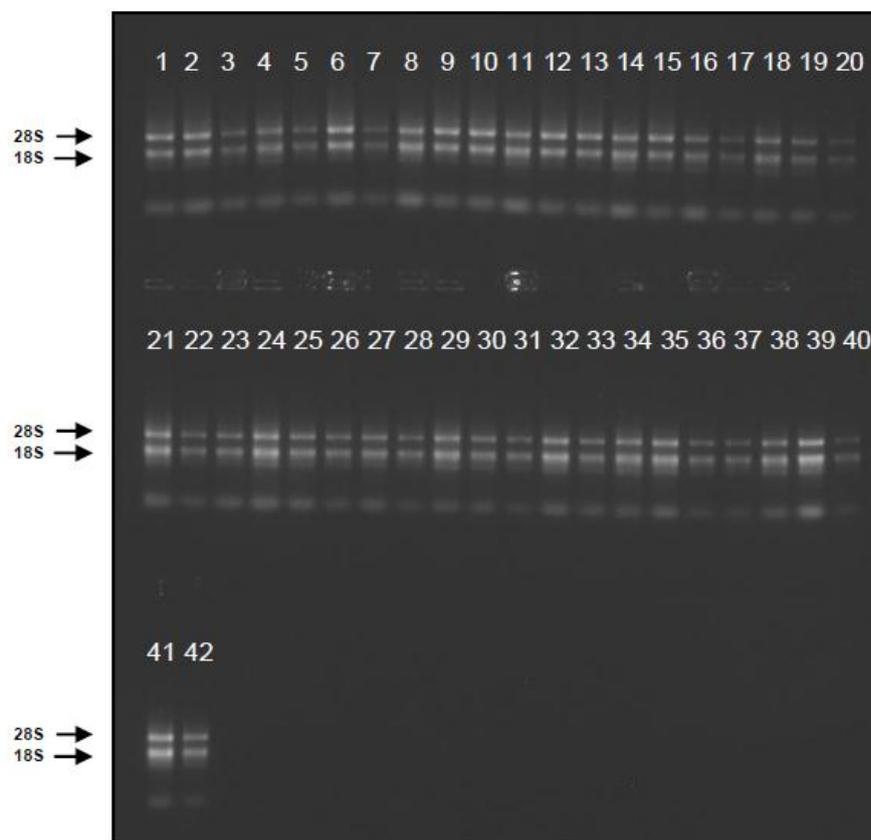


Figura 06. Eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v). Em cada coluna foi aplicado 1,0 μ g de RNA total extraído do tecido foliar (folha+1) das três repetições biológicas das variedades de cana-de-açúcar.

Para comprovar a ausência de DNA genômico nas amostras dos RNAs extraídos e tratados com DNase, uma alíquota do RNA total foi submetida a PCR com um par de “primers” do gene constitutivo GAPDH. A análise, em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, do produto desta reação não revelou a amplificação do gene constitutivo, comprovando a ausência de contaminação dos RNAs totais por DNA genômico (Figura 07).

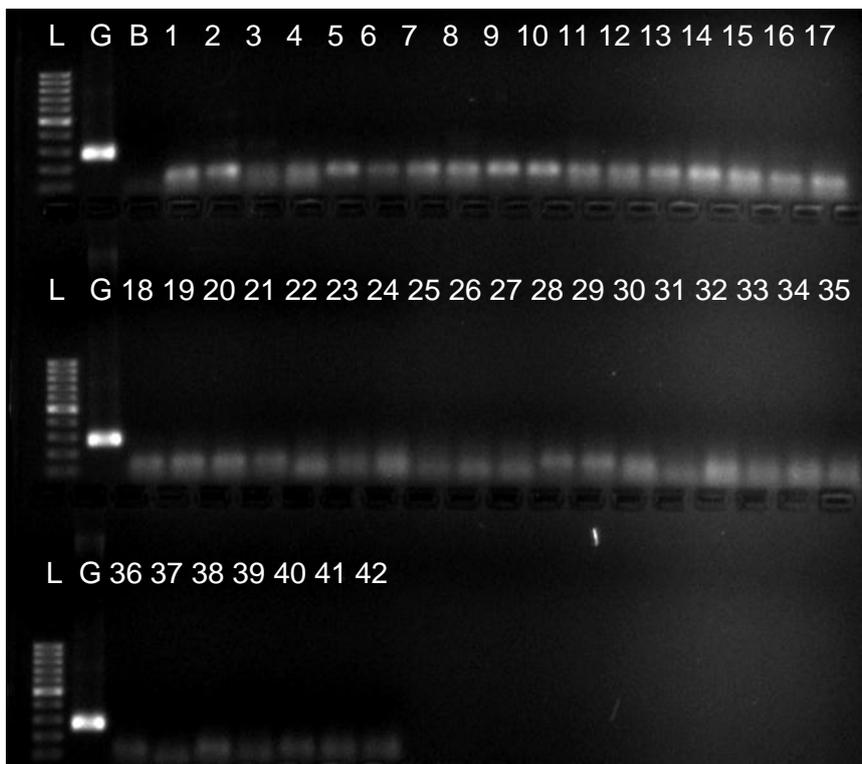


Figura 07. Gel de agarose a 1% mostrando ausência de amplificação do produto da PCR realizado com um par de “primers” do gene constitutivo GAPDH nas amostras de RNA (1 a 42). L: Marcador de peso molecular 1kb, G: DNA genômico utilizado como controle, B: branco.

Desta forma, as amostras utilizadas para a técnica de cDNA-AFLP não apresentaram DNA genômico, o qual também poderia ser alvo das enzimas de restrição.

4.3 Comprovação da presença do vírus por diagnóstico molecular (RT-PCR)

O diagnóstico molecular via RT-PCR revelou, após a eletroforese, em gel de agarose a 1%, a presença de bandas específicas de 888 pb (pares de bases) em todos os tratamentos cujas plantas foram inoculadas com SCMV e ausência deste fragmento nos tratamentos sem inoculação, comprovando a presença do SCMV nas plantas que foram inoculadas (Figura 08).

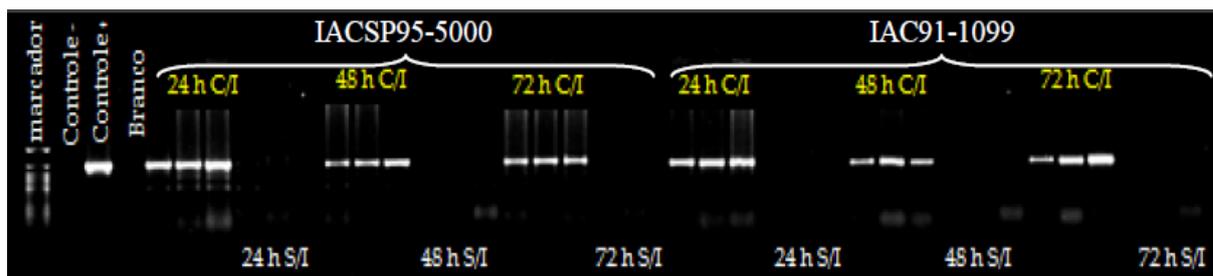


Figura 08. Diagnóstico molecular para detecção da presença do SCMV em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo mostrando a presença do fragmento de 888 pb nas plantas Inoculadas (C/I) e ausência do fragmento nas plantas não inoculadas (S/I) nos diferentes tempos de coleta das variedades IACSP95-5000 e IAC91-1099.

4.4 Obtenção dos Fragmentos Diferencialmente Expressos (FDEs) via cDNA-AFLP

De forma geral, os géis obtidos foram de boa qualidade permitindo que a identificação e comparação dos fragmentos diferencialmente expressos (FDEs) entre as variedades, ao longo dos tempos de amostragens, fosse feita de forma confiável (Figura 09).

Para facilitar a identificação e comparação dos FDEs foram aplicadas no gel amostras da variedade resistente (A) com e sem inoculação, bem como da variedade suscetível (B) com e sem inoculação, por tempo de amostragem (Figura 09).

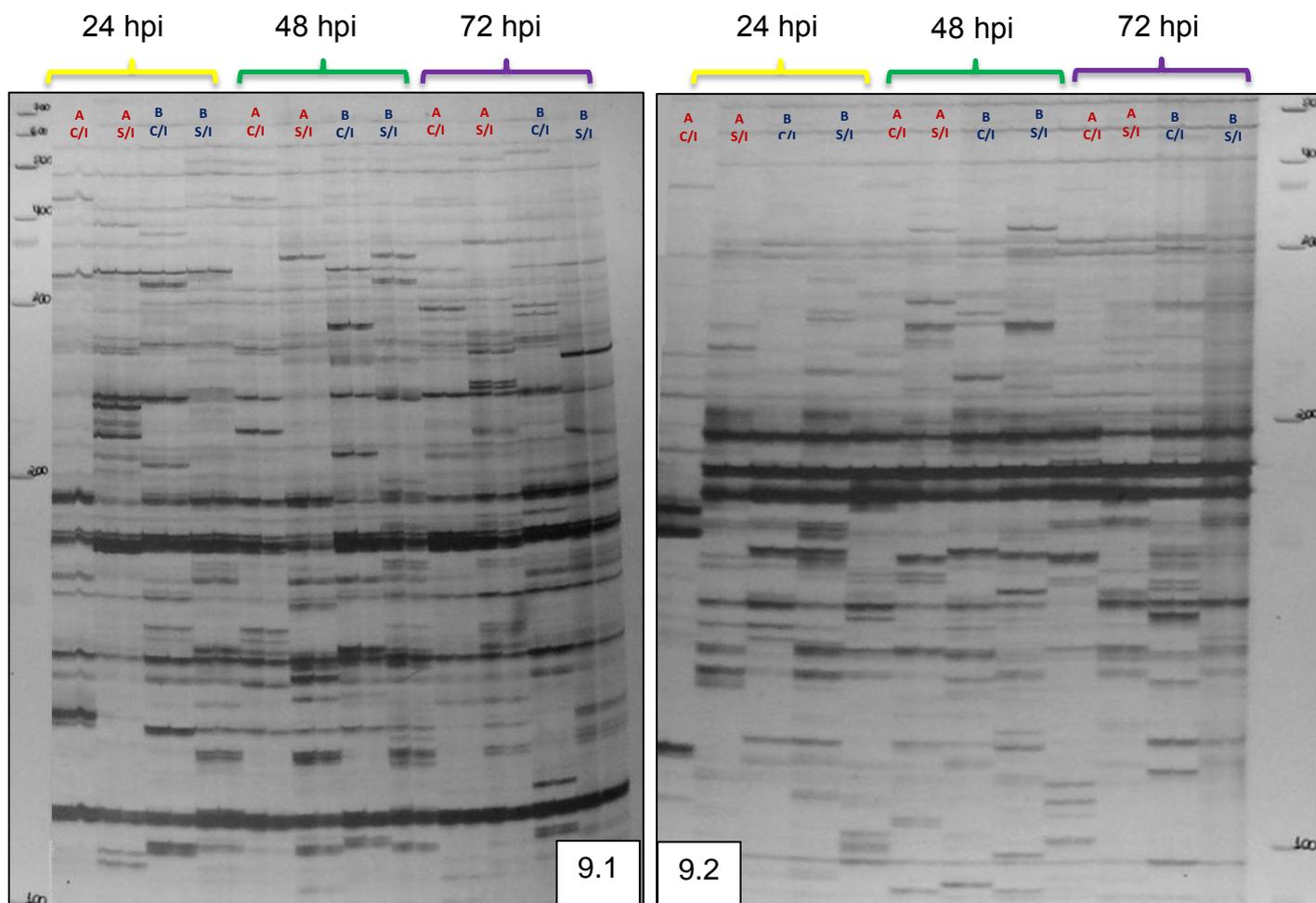


Figura 09. Perfis de expressão revelados pelas combinações 9.1: E-ACT/M₁CTA e 9.2: E-AAA/M₁CTT, 24, 48 e 72 hpi (horas após a inoculação). A: Variedade resistente (IACSP95-5000) e B: Variedade suscetível (IAC91-1099); C/I (com inoculação) e S/I (sem inoculação).

4.5 Comportamento dos FDEs ao longo dos tempos de amostragens (horas após a inoculação)

O número de fragmentos diferencialmente expressos (FDEs) observados para cada variedade, apenas nos tratamentos com inoculação (I), os quais podem corresponder a prováveis genes induzidos, assim como o número de FDEs observados apenas nos controles (R), os quais podem corresponder a prováveis genes reprimidos nas respectivas variedades inoculadas, obtidos para cada uma das 16 combinações seletivas estão apresentados na Tabela 02.

Tabela 02. Número de fragmentos diferencialmente expressos (FDEs) observados para cada variedade em cada tempo de amostragem. I: FDE na variedade inoculada (indução); R: FDE na variedade sem inoculação (reprimido).

Variedade	IACSP95-5000						IAC91-1099						Total
	24 horas		48 horas		72 horas		24 horas		48 horas		72 horas		
	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	
E-ACA/M ₁ CTT	5	8	9	7	4	4	8	5	6	6	2	4	68
E-AAA/M ₁ CTT	7	8	7	8	6	3	0	4	6	7	6	4	66
E-ACT/M ₁ CTA	4	5	4	6	3	6	6	4	4	7	6	4	59
E-ACC/M ₁ CTT	7	7	7	7	4	6	5	5	11	6	8	4	77
E-AAG/M ₁ CTT	3	5	2	4	3	3	1	1	4	6	2	1	35
E-ACT/M ₁ CTT	5	6	5	3	5	1	4	4	5	8	6	4	56
E-ACT/M ₁ CAA	6	5	1	3	1	0	4	3	3	6	1	3	36
E-AAC/M ₁ CGT	7	3	5	4	1	2	3	3	4	4	1	1	38
E-AAG/M ₁ CGT	1	2	2	4	3	3	4	1	3	6	3	3	35
E-AAC/M ₂ ACT	5	2	1	5	2	2	2	4	1	3	3	3	33
E-AAC/M ₂ TCG	1	1	3	1	2	2	0	0	2	1	2	2	17
E-ACG/M ₂ ACT	8	3	3	5	2	6	5	4	1	2	5	2	46
E-AAC/M ₂ GAA	4	2	2	3	2	1	3	1	4	4	3	2	31
E-AAC/M ₂ ACA	6	5	11	5	8	4	5	5	4	8	8	3	72
E-ACG/M ₂ TTG	9	6	3	1	3	5	4	3	6	5	9	7	61
E-AGC/M ₂ ACA	4	2	3	2	3	4	4	3	3	3	7	4	42
Total	82	70	68	68	52	52	58	50	67	82	72	51	772
	152		136		104		108		149		123		

E- *EcoRI*; M1- *MseI*; M2-*MspI*

Verifica-se, que no total, foram obtidos 772 FDEs, dos quais 392 observados na variedade resistente (IACSP95-5000) e 380 na suscetível (IAC91-1099). A combinação seletiva *Eco-AAC-Msp-TCG* foi a que detectou o menor número de FDEs (17), enquanto o maior (77) foi observado para a combinação *Eco-ACC/Mse-CTT* (Tabela 02).

Comparando o número de FDEs que podem corresponder a genes induzidos e reprimidos, ao longo dos tempos após a inoculação, entre a variedade resistente e suscetível, observa-se um comportamento diferencial das variedades ao longo dos tempos (Figura 10). A variedade resistente apresentou um número maior de FDEs, correspondentes a prováveis genes induzidos no tempo de 24 horas após a inoculação (hpi) em relação a suscetível, diminuindo com o passar do tempo de

inoculação. Já na variedade suscetível o número de FDEs correspondentes a prováveis genes induzidos aumentou com o tempo de inoculação.

O número de FDEs, que podem corresponder a genes reprimidos nas variedades inoculadas, diminuiu ao longo dos tempos após a inoculação na variedade resistente, enquanto na suscetível houve um aumento crescente, atingindo o ponto máximo 48 hpi (Figura 10).

4.6 Identificação de FDEs exclusivos da variedade resistente (IACSP95-5000)

Para a identificação de transcritos que poderiam estar relacionados diretamente com a resistência ao mosaico foram selecionados FDEs em duas situações: na primeira, para cada tempo de amostragem (24, 48 e 72 hpi) selecionou-se os FDEs presentes exclusivamente na variedade resistente (IACSP95-5000) inoculada, porém ausente no seu controle (sem inoculação) bem como na variedade suscetível (IAC91-1099) com e sem inoculação; na segunda situação, para cada tempo de amostragem selecionou-se os FDEs presentes tanto na variedade resistente sem inoculação (controle) como na variedade suscetível com e sem inoculação, porém ausente na variedade resistente inoculada (Figura 11).

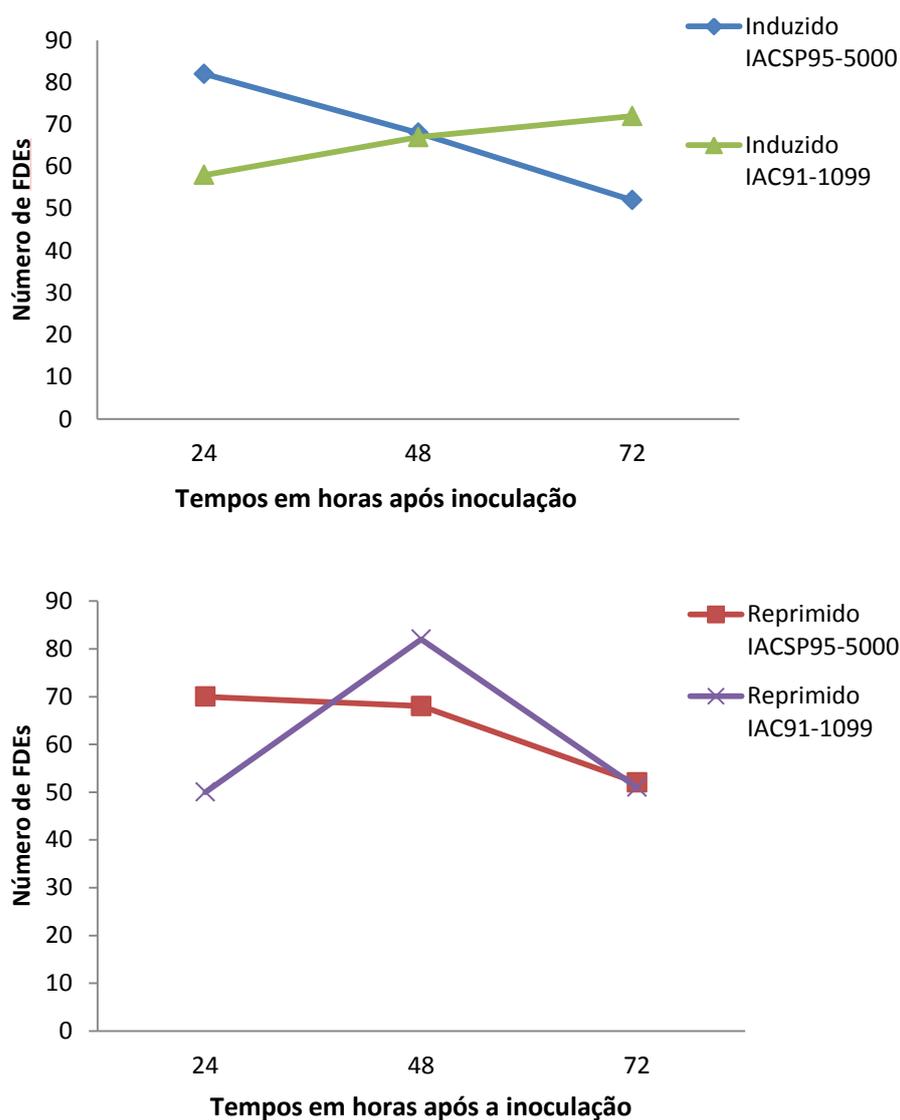


Figura 10. Distribuição do número de FDEs em relação aos tempos de amostragens.

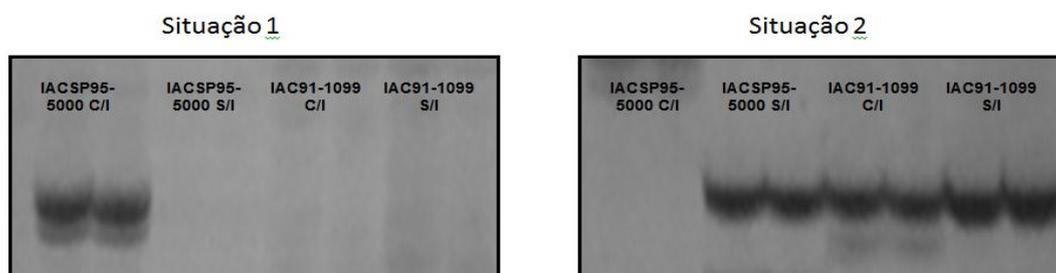


Figura 11. Fragmentos diferencialmente expressos revelados em gel de poliacrilamida 6% em duas situações de interesse (Situação 1 e Situação 2).

A primeira situação refere-se aos prováveis genes induzidos, exclusivamente na variedade resistente em resposta a inoculação com SCMV, enquanto a segunda, aos prováveis genes reprimidos em resposta a inoculação com o vírus (Figura 12).

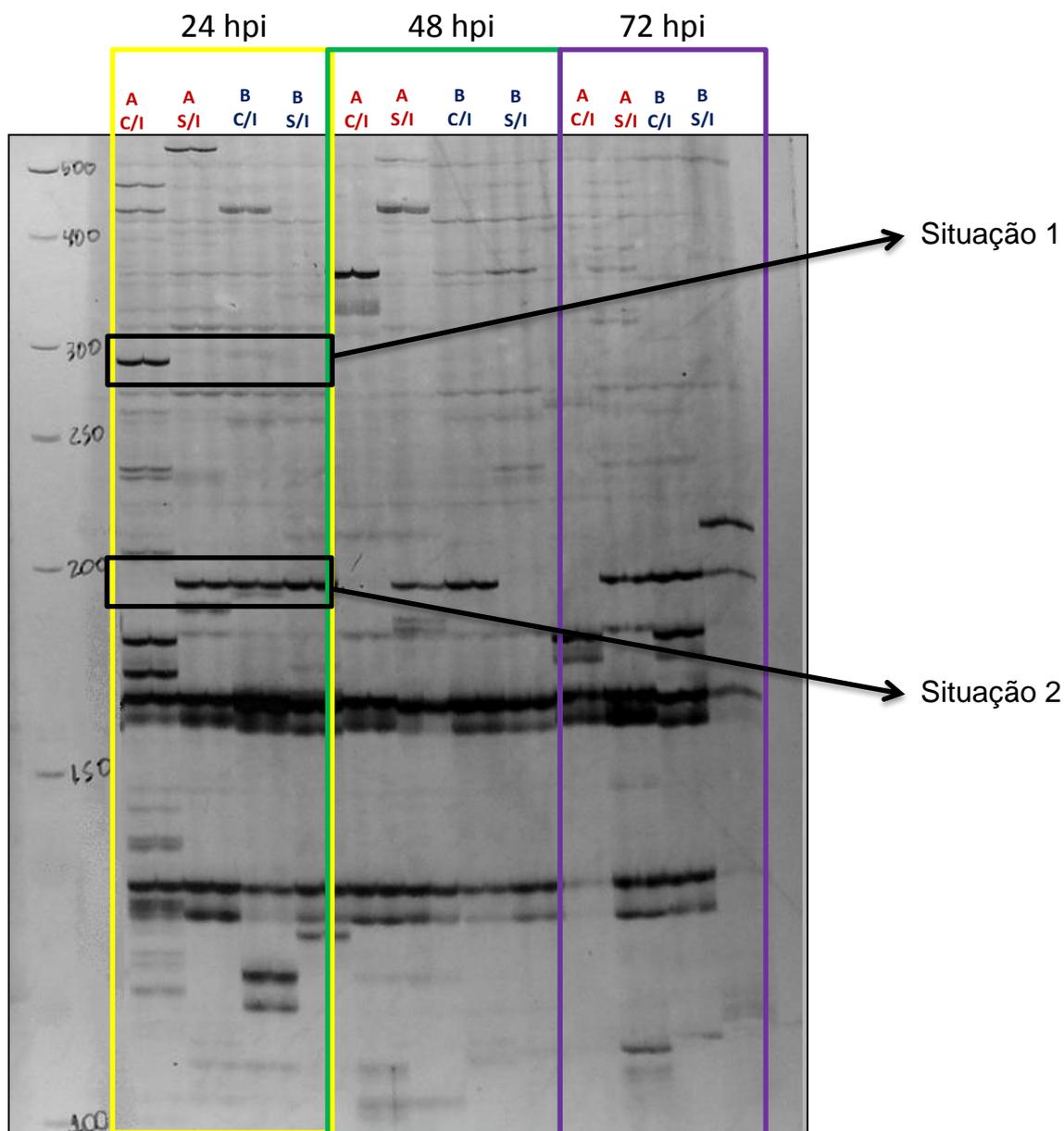


Figura 12. Perfil exibido pela combinação ACG/ACT em gel de poliacrilamida 6% com destaque os FDEs exclusivos da variedade resistente com inoculação em duas situações de interesse. A: Variedade resistente (IACSP95-5000); B: Variedade suscetível (IAC91-1099); C/I: com inoculação e S/I: sem inoculação com o vírus.

Desta forma, foi possível identificar com as 16 combinações de “primers” seletivos avaliados, 66 FDEs, dos quais 57 (86%) FDEs podem corresponder a

genes induzidos exclusivamente na variedade resistente quando inoculada com a estirpe Rib-1 e 9 (14%) FDEs a genes reprimidos nesta mesma situação. Observa-se também, que a maior parte dos FDEs que podem corresponder a genes induzidos foi observada 24 hpi (Tabela 03).

Tabela 03. Número de fragmentos diferencialmente expressos (induzidos e reprimidos) exclusivamente na variedade IACSP95-5000 nos tempos de amostragens (horas após a inoculação com a estirpe Rib-1).

Tempos (horas)	Induzidos apenas na IACSP95-5000	Reprimidos apenas na IACSP95-5000
24	32	4
48	12	4
72	13	1
Total	57	9

4.7 Clonagem e sequenciamento dos FDEs

Os FDEs induzidos e reprimidos exclusivamente na variedade resistente foram excisados do gel, reamplificados, e dentre os 57 FDEs induzidos, foram escolhidos 23 para a clonagem e sequenciamento. Os fragmentos foram escolhidos de acordo com a intensidade e definição da banda no gel de poliacrilameida 6% e tamanho dos FDEs de acordo com o número de pares de bases (pb).

A clonagem e o sequenciamento dos FDEs foram realizados no laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico. Foi verificada a eficiência da transformação das bactérias contendo o plasmídeo com o inserto, e as colônias transformantes (cor branca) (Figura 13) foram submetidas a PCR utilizando “primers” do vetor de clonagem e foi possível visualizar em gel de agarose 1% o produto de PCR contendo a banda correspondente aos insertos de tamanhos (pb) estimados anteriormente (Figura 14).

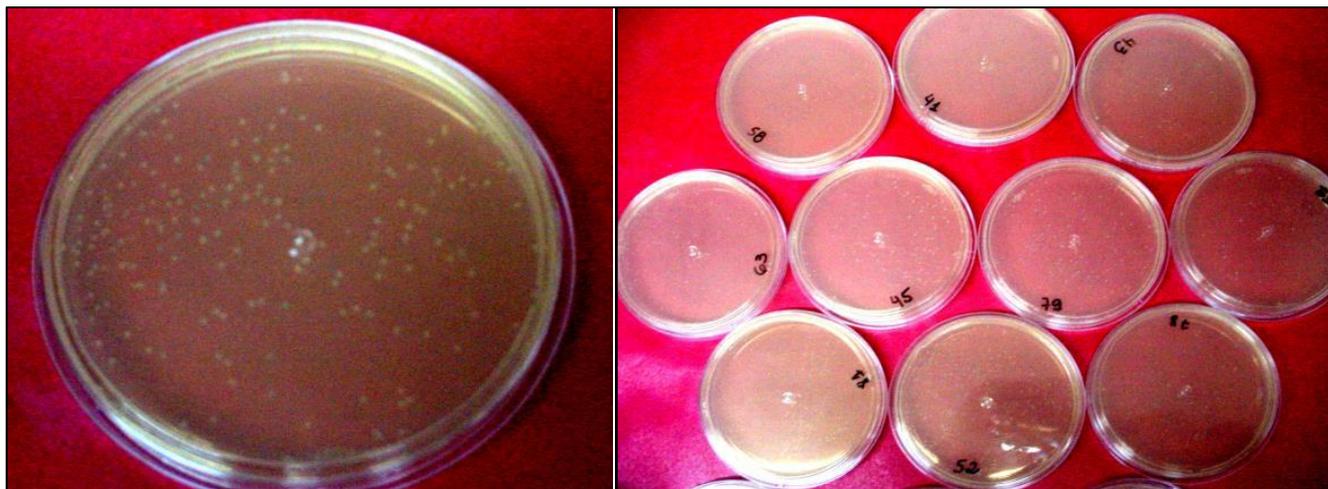


Figura 13. Colônias transformantes (cor branca) contendo os FDEs selecionados para a clonagem e sequenciamento.

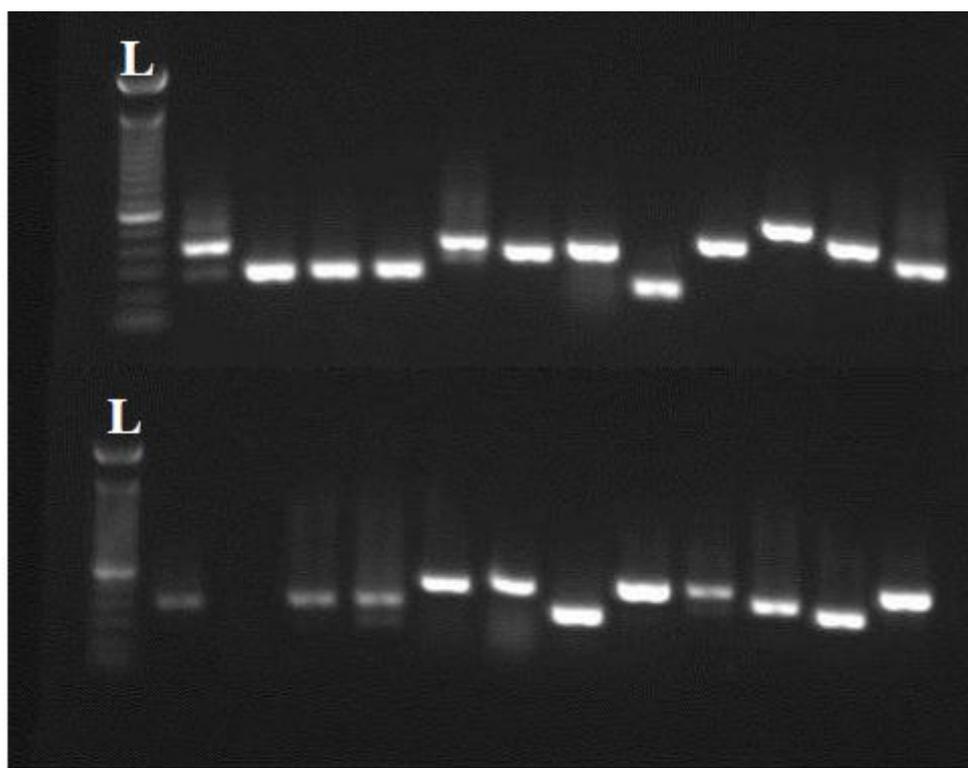


Figura 14. Visualização em gel de agarose 1% do produto de PCR de colônias transformantes, com tamanho molecular correspondente à região amplificada entre os promotores T7 e SP6 do vetor + inserto. L: Marcador de peso molecular 1kb.

4.8 Análise das Sequências dos FDEs

Dos 57 fragmentos diferencialmente expressos exclusivamente pela variedade resistente (Tabela 03), foram escolhidos aleatoriamente 23 para a clonagem e sequenciamento. Após o sequenciamento, 13 FDEs apresentaram boa leitura de bases e foram submetidos a análise de similaridade. Dos treze FDEs sequenciados, dez mostraram sucessos significativos, ou seja, E-value com valores abaixo de $1e-5$ (Tabela 04). O FDE de número 45 identificado 24 hpi apresentou identidade de 93% com uma sequência de retrotransposon de cana-de-açúcar e o FDE de número 52, também identificado 24 hpi, apresentou identidade de 100% com uma sequência completa de RNA ribossomal de *Miscanthus*. Já os fragmentos 63 e 82, ambos identificados 24 hpi apresentaram identidade de 87% e 93% respectivamente a sequências de RNA mensageiro de proteínas hipotéticas de sorgo.

No tempo de 48 hpi, os FDEs identificados (41 e 52) apresentaram identidade com proteínas hipotéticas de sorgo (SORBIDRAFT). O FDE 41 mostrou 88% de identidade com a SORBIDRAFT_06g022385 enquanto o FDE 58 com a SORBIDRAFT_01g024221, cuja sequência confrontada com o banco de dados Uniprot, não apresentou dados referentes a suas funções moleculares e localização subcelular.

No tempo de 72 hpi, o FDE 14 apresentou 80% de identidade com uma proteína do milho com motivo VQ enquanto o FDE 21 apresentou identidade de 65% com a proteína hipotética de sorgo SORBIDRAFT_03g023980. Esta última, quando confrontada ao banco de dados de proteínas Uniprot sua sequência não apresentou informações referentes às suas possíveis funções moleculares. O fragmento 81, também identificado no tempo de 72 hpi apresentou 100% de identidade a uma sequência de cloroplasto do híbrido SP-80-3280 de cana-de-açúcar.

Tabela 04. Porcentagem de identidade de sequência dos FDEs detectados em cana-de-açúcar em diferentes tempos após a inoculação (hpi) com o SCMV Rib-1.

FDE	Combinação	Tamanho (pb)	Nº Acesso	Similaridade	E-value	Query Cover	%Identidade
24 horas após a Inoculação							
45	AAC/CGT	100	JN800037.1	Saccharum hybrid cultivar R570 isolate RLG_scDEL_1.1 retrotransposon, complete sequence	7,00E-12•	53%	93%
52	AAC/ACT	300	JX457396.1	Miscanthus sinensis 23S ribosomal RNA (rrn23S) gene partial sequence; 4.5S ribosomal RNA (rrn4.5S) gene complete sequence; and 5S ribosomal RNA (rrn5S) gene, partial sequence; chloroplast	2,00E-60•	79%	100%
63	AAC/GAA	330	XM_002453856.1	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	7,00E-77•	83%	87%
82	ACG/ACT	160	XM_002444994.1	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	1,00E-51•	83%	93%
48 horas após a Inoculação							
29	ACT/CTA	220	—	Nenhuma Similaridade	—	—	—
41	AAC/CGT	450	XP_002448166.1	hypothetical protein [Sorghum bicolor] SORBIDRAFT_06g022385	1,00E-69†	91%	88%
58	AAC/TCG	200	XP_002467304.1	hypothetical protein [Sorghum bicolor] SORBIDRAFT_01g024221	6,00E-08†	37%	84%
78	ACG/ACT	350	—	Nenhuma Similaridade	—	—	—

Continuação

								72 horas após a Inoculação	
14	ACC/CTT	280	NP_001150511.1	VQ motif family protein [<i>Zea mays</i>]	1,00 E-14†	41%	80%		
21	ACT/CTT	140	XP_002455751.1	hypothetical protein [<i>Sorghum bicolor</i>] SORBIDRAFT_03g023980	4,00E-14†	47%	65%		
28	ACT/CTA	300	BT068454.2	<i>Zea mays</i> full-length cDNA clone ZM_BFb0190K24 mRNA, complete cds	3,00E-31•	31%	92%		
34	ACA/CTT	290	–	Nenhuma Similaridade	–	–	–		
81	ACG/ACT	180	AE009947.2	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar SP-80-3280 chloroplast, complete genome	4,00E-72•	83%	100%		

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 BlastN; † Alinhamento usando a ferramenta BlastX.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, duas variedades contrastantes quanto a resistência ao vírus do mosaico foram investigadas ao nível transcricional, em resposta a inoculação com uma estirpe agressiva do vírus (GONÇALVES et al. 2007), pela técnica de cDNA-AFLP. A utilização de mudas provenientes da cultura de tecidos garantiu que o ensaio fosse conduzido com plantas isentas de vírus e, portanto, descartando-se qualquer possibilidade de ocorrência de proteção cruzada, ou seja, ocorrência de resistência da planta a uma estirpe do vírus induzida pela infecção sistêmica de uma segunda estirpe (GAL-ON; SHIBOLETH, 2006) e que, portanto, pudesse interferir na manifestação fenotípica dos sintomas esperados para estas duas variedades. De fato, após 30 dias da inoculação, nenhum sintoma de mosaico foi observado na variedade resistente IACSP95-5000 ao passo que na IAC91-1099 (suscetível) foram observados sintomas típicos da doença. Lin et al. (2013) estudando a expressão gênica diferencial em *Cucumis metuliferus* em resposta à infecção por *Papaya ringspot vírus* (PRSV) também observaram que plantas da linhagem PI 292190, resistente ao vírus, não apresentaram sintomas da doença quando inculadas com PRSV, indicando que a planta apresenta uma resistência extrema ou resposta imune, mas não Reação de Hipersensibilidade.

A ausência de vírus nas mudas micropropagadas, assim como a presença e ausência do vírus, respectivamente, nos tratamentos com e sem inoculação, em todos os tempos investigados foi confirmada por diagnóstico molecular (RT-PCR), cuja técnica apresenta alta sensibilidade e robustez na detecção de quantidades pequenas do vírus (GONÇALVES et al. 2012). Desta forma, espera-se que os FDEs aqui revelados pela técnica de cDNA-AFLP reflitam alterações do perfil de transcrição dentro e entre as variedades contrastantes quando desafiadas pelo vírus do mosaico.

De acordo com Borrás-Hidalgo et al. (2005) a técnica de cDNA-AFLP é capaz de revelar alterações na expressão de qualquer gene, desde que o mesmo tenha os sítios de restrição escolhidos para a análise. Neste trabalho foram explorados polimorfismos obtidos com as combinações de enzimas *EcoRI/MseI* e *EcoRI/MspI* considerando para cada caso, “primers” com três bases seletivas. Wang e Bughrara, (2005), Xiao e Tang (2009) ressaltam que, a escolha da combinação de enzima a

ser utilizada é crucial para a técnica de cDNA-AFLP, uma vez que, para investigar o padrão de expressão, considerando o genoma como um todo (ou a descoberta de FDEs), as enzimas de restrição devem reconhecer e cortar de forma otimizada cada molécula de cDNA derivada do genoma em estudo. Caso os genes transcritos não possam ser reconhecidos pela enzima de restrição utilizada, pode-se perder a oportunidade da descoberta destes genes. Outro ponto a considerar é que, em nosso trabalho, a utilização de “primers” com três bases seletivas contribuíram para minimizar a probabilidade de ampliações não específicas, já que na análise de cDNA-AFLP, produtos de PCR não seletivos podem ser eliminados aumentando o comprimento do “primer” seletivo.

Na média, o número de FDEs obtidos com a combinação de enzimas *EcoRI/MseI* foi maior ao obtido com a combinação *EcoRI/MspI*. Tais diferenças podem estar associadas à frequência dos sítios de restrição de corte raro (TTAA) e (CCGG), reconhecidos, respectivamente, pelas enzimas *MseI* e *MspI* nos transcritos obtidos.

De forma geral, a técnica de cDNA-AFLP se mostrou eficaz no sentido de exibir um perfil de FDEs durante a interação entre plantas de cana-de-açúcar com o vírus do mosaico (SCMV). A variedade resistente apresentou um perfil de expressão bem diferente da variedade suscetível, principalmente, no que se refere à indução e repressão de FDEs ao longo dos tempos após a inoculação. Resultados semelhantes também foram observados por Borrás-Hidalgo et al. (2005) em estudo de identificação de genes induzidos e reprimidos em somaclones resistentes de cana-de-açúcar, após inoculação, respectivamente com *Ustilago scitaminea* e *Bipolaris sacchari*, no qual, foi observado um maior número de FDEs induzidos em relação aos reprimidos em resposta a inoculação com estas duas espécies de fungos. Cheng et al. (2010), utilizando a mesma técnica para a identificação de genes diferencialmente expressos em resposta a inoculação com o vírus do mosaico do bambu (BaMV) em *Nicotiana benthamiana*, também verificou número maior de FDE ativados em relação aos reprimidos após inoculação com BaMV.

Esse comportamento pode estar relacionado à capacidade das plantas resistentes em reconhecer o patógeno no início do processo de infecção e, assim, montar uma resposta de defesa eficaz. De acordo com Soosaar, Burch-Smith e

Dinesh-Kumar (2005) as interações entre as plantas e os micro-organismos são complexas, e a resposta de defesa é iniciada logo após a detecção do vírus pela planta.

Além disso, a distribuição do número de FDE na variedade resistente, ao longo dos tempos de amostragens (horas após a inoculação) sugere que coletas para estudos de expressão gênica durante as primeiras 24 horas após a infecção viral, talvez, possam levar a um maior número de transcritos diferencialmente expressos.

A análise preliminar dos FDEs aqui sequenciados mostrou identidade de sequência com genes envolvidos em vários eventos moleculares, de certa forma, relacionados às respostas das plantas ao estresse. De fato, no tempo de 24 hpi foi identificado, na variedade resistente, um FDE com similaridade a uma sequência de retrotransposon de cana-de-açúcar. Thokoane e Rutherford (2001) também identificaram um FDE com similaridade a um LTR (*Long terminal repeat*) retrotransposon do tipo gypsy em uma variedade resistente de cana-de-açúcar em resposta ao ataque ao carvão (*Ustilago scitaminea*). Os elementos transponíveis foram inicialmente associados à resposta aos estresses por McClintock em 1965 (SLOTKIN; MARTIENSSSEN, 2007). Esses elementos transponíveis podem afetar genes próximos pela geração de um conjunto diverso de pequenos RNAs que desencadeiam os mecanismos de silenciamento gênico (DOMINGUES et al., 2012). No caso das viroses de plantas, acredita-se que o mecanismo primário de defesa da planta esteja baseado principalmente no silenciamento do RNA (ZVEREVA e POOGGIN, 2012).

Dos três FDEs identificados no tempo de 48 hpi, merece destaque o FDE associado a uma proteína denominada SORBIDRAFT_06g022385, que participa dos processos metabólicos de carboidratos, cujas funções moleculares exibidas pelo Gene Ontology (GO) compreendem a atividade das hidrolases. Segundo Barros et al. (2010) as hidrolases, as quais promovem a desorganização celular dos patógenos, se enquadram na categoria das proteínas PR (*Pathogenesis Related*). As proteínas PR são proteínas de plantas produzidas em resposta a infecção por patógenos. Em tabaco, proteínas PR (grupo 1) foram intimamente associadas com a

localização do vírus e encontradas em maiores quantidades onde a propagação do vírus foi interrompida (EVERED et al., 2007).

Hidrolases β -1,3-glucanases foram detectadas em várias plantas após o contato com patógenos, substâncias químicas que agem como indutores de resistência ou metabólitos provenientes de micro-organismos. Essas hidrolases têm sido associadas a mecanismos de defesa contra fitopatógenos (STANGARLIM; PASCHOLATI, 2001). De acordo com Pieterse, Ton e Van Loon (2001) essas hidrolases estão particularmente associadas com a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR), ativada em diferentes interações patógeno-hospedeiro.

No tempo de 72 hpi, dos 4 FDE sequenciados, merece destaque o FDE com similaridade a uma proteína do milho com motivo VQ. Segundo Xie et al. (2010) as proteínas da família contendo o motivo VQ podem atuar como um elo para a conexão na sinalização de defesa.

Os fragmentos que não apresentaram identidades de sequência significativas nos bancos de dados investigados, provavelmente representam genes ainda desconhecidos que podem estar relacionados a funções importantes para o mecanismo de resistência das plantas a patógenos, possivelmente a resistência ao SCMV e a fatores bióticos.

No presente trabalho, o sequenciamento e a análise da similaridade, de um número maior de FDEs poderá permitir não apenas uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência envolvidos na interação da cana-de-açúcar, especificamente com o vírus do mosaico, como também a utilização de alguns genes candidatos identificados via cDNA-AFLP para o desenvolvimento de marcadores moleculares a serem utilizados no mapeamento genético para à resistência ao mosaico da cana-de-açúcar.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados aqui apresentados concluiu-se que:

As variedades aqui estudadas foram contrastantes quanto ao perfil de transcrição em resposta a inoculação com a estirpe agressiva do vírus do mosaico.

A resposta diferencial entre as variedades estudadas ao longo dos diferentes tempos de amostragens demonstraram que as mesmas apresentam mecanismos diferentes de resposta contra a infecção viral.

Os transcritos exclusivos da variedade resistente IACSP95-5000 podem ser utilizados na identificação de genes candidatos para resistência ao mosaico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEGRIA, O. M.; ROYER, M.; BOUSALEM, M.; CHATENET, M.; PETERSCHMITT, M.; GIRARD, J. C.; ROTT, P. Genetic diversity in the coat protein coding region of eighty-six *sugarcane mosaic virus* isolates from eight countries, particularly from Cameroon and Congo. **Archives of Virology**, v. 148, p. 357-372, 2003.

BACHEM, C. W. B.; HOEVEN VAN DER, R. S.; DE BRUIJN, S. M.; VREUGDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R. G. F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **The Plant Journal**, v. 9, n. 5, p. 745-753, 1996.

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

BARROS F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA L. C. C.; JULIATTI, F. C. Indução De Resistência Em Plantas Contra Fitopatógenos. **Biosciense Journal**, 26, 231-239, 2010.

BERGER, P. H.; ADAMS, M. J.; BARNETT, O. W.; BRUNT, A. A.; HAMMOND, J.; HILL, J. H.; JORDAN, R. L.; KASHIWAZAKI, S.; RYBICKI, E. P.; SPENCE, N.; STENGER, D. C.; OHKI, S. T.; UYEDA, I.; VAN ZAAYEN, A.; VALKONEN, J. P.; VETTEN, H. J. Family *Potyviridae*. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERG, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego. Elsevier Academic Press. 2005.

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.

BRANCO, D. S. **Sinalização por carboidratos em cana-de-açúcar e divergência evolutiva**. 2008. 203 f. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.

BREYNE, P.; DREESEN, R.; CANNOOT, B.; ROMBAUT, D.; VANDEPOELE, K.; ROMBAUTS, S.; VANDERHAEGHEN, R.; INZÉ, D.; ZABEAU, M. Quantitative cDNA- AFLP analysis for genome-wide expression studies. **Molecular Genetics and Genomics**. v.269, n.2, p.173-9, 2003.

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**, Amsterdam, v. 43, 1115–1121, 2005.

BUTTERFIELD M. K.; RUTHERFORD, R. S.; CARSON, D. L.; HUCKETT, B. I. Application of gene discovery to varietal improvement in sugarcane. **South African Journal of Botany**, v. 70, n. 1, p. 167–172, 2004.

CAMPALANS, A.; PAGÈS, M.; MESSEGUER, R. Identification of differentially genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (*Prunus amygdalus*). **Tree Physiology**, v. 21, p. 633-643, 2001.

CARMONA, E.; VARGAS, D.; BORROTO, C. J.; LOPEZ, J.; FERNÁNDEZ, A. I.; ARENCIBIA, A.; BORRÁS-HIDALGO, O. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression during the interaction between sugarcane and *Puccinia melanocephala*. **Plant Breeding**, v. 123, p. 499-501, 2004.

CHEN R.; LIU L.; WAN X. Q.; QIU E. J.; WANG C. J.; SONG B. G.; YAN P. Q.; YANG T. Z. cDNA-AFLP Analysis of Differentially Expressed Genes in Tobacco Infected by *Tobacco Mosaic Virus*. **Acta Agron Sin**, 38(1): 62–70, 2012.

CHENG, S. F.; HUANG, Y. P.; WU, Z. R.; HU, C. C.; HSU, Y. H.; TSAI, C. H. Identification of differentially expressed genes induced by *Bamboo mosaic virus* infection in *Nicotiana benthamiana* by cDNA-amplified fragment length polymorphism. **BMC Plant Biol**. v. 10, p. 286, 2010.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar** - Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em 10 de novembro de 2013.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; ARRUDA, S. C. Moléstias de vírus e de micoplasmas do milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 4, p. 39-41, 1971.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299-306, 2001.

DIPIERO, R. M.; REZENDE, J. A. M.; YUKI, V. A.; PASCHOLATI, S. F.; DELFINO, M. A.. Transmissão do *Passionfruit woodiness vírus* por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização de maracujazeiro pelo vetor. **Neotropical Entomology**, v. 35, n.1, p.139-140, 2006.

DOMINGUES D. S.; CRUZ, G. M. Q.; METCALFE C. J.; NOGUEIRA F. T. S., VICENTINI R.; ALVES C. S.; SLUYS M. A. V. Analysis of plant LTR-retrotransposons at the finescale family level reveals individual molecular patterns. **BMC Genomics**. v.13, p. 137, 2012.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J.C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, Ottawa, v.41, p.221-225. 1998.

ECKEY, C.; KORELL, M.; LEIB, K.; BIEDENKOPF, D.; JANSEN, C.; LANGEN, G.; KOGEL, K. H. Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 55, n. 1, p. 1-15, 2004.

EVERED, D.; HARNETT, S.; ANTONIW, J. F.; WHITE, R. F. **The Role of Pathogenesis-Related Proteins**. Published Online: 28 SEP 2007.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. Eds. **Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego. Elsevier Academic Press. 2005.

FELIX, J. M. **Análise de expressão gênica envolvida no metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2006. 162 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Circular Técnica n. 26, 1997.

GAL-ON, A., SHIBOLETH, Y. M. "Cross protection", in *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*, ed. Loebenstein G., Carr J. P., editors. **Dordrecht: Springer**. p. 261–288, 2006.

GONÇALVES, M. C.; MOREIRA, Y. J. C. B.; MAIA, I. G.; SANTOS, A. S.; FANTIN, G. M.; CHAVES, A. Identificação e caracterização de isolados pertencentes ao subgrupo do *Sugarcane mosaic virus* no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira** 29, 129-129, 2004.

GONÇALVES, M. C., SANTOS, A. S., MAIA, I. G., CHAGAS, C. M.; HARAKAVA, R. Caracterização de um isolado do *Sugarcane mosaic virus* que quebra a resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p. 32-39, 2007.

GONÇALVES, M. C.; PINTO, L. R.; CRESTE SOUZA, S; LANDELL, M. G. Virus Diseases of Sugarcane. A Constant Challenge to Sugarcane Breeding in Brazil. **Functional Plant Science & Biotechnology**, v. 6, p. 125-130, 2012.

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

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS E. B.; LEFKOWITZ E. J. **Virus Taxonomy – Classification and Nomenclature of Viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. 2012.

LAO, M.; ARENCIBIA, A. D.; CARMONA, E. R.; ACEVEDO, R.; RODRIGUEZ, E.; LEON, O.; SANTANA, I. Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Saccharum* spp. after inoculation with the host pathogen *Sporisorium scitamineum*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 6, p. 1103-1111, 2008.

LIN, Y. T.; JAN, F. J.; LIN, C. W.; CHUNG, C. H.; CHEN, J. C.; Yeh S. D.; Ku H. M. Differential Gene Expression in Response to *Papaya ringspot virus* Infection in *Cucumis metuliferus* Using cDNA- Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. **PLoS ONE** 8(7), 2013.

LOPES, L. **Expressão gênica diferencial em cana-de-açúcar em resposta ao ataque de cigarrinha-das-raízes**. 2013. 48p. Dissertação (Mestrado em Agronomia

– Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Cana-de-açúcar. Disponível em: <www.agricultura.com.br>. Acesso em 15 de novembro de 2013.

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

MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; ZIMMER, P. D. cDNA-AFLP na identificação de genes relacionados a qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 48-53, 2009.

MILIONI, D.; SADO, P. E.; STACEY, N. J.; ROBERTS, K.; MCCANN, M. C. Early gene expression associated with the commitment and differentiation of a plant tracheary element revealed by cDNA-amplified fragment length polymorphism analysis, **Plant Cell**, n.14, p.2813–2824. 2002.

PALHARES, A. C. **Mapeamento genético de marcadores AFLP e de retrotransposons em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2010. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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.

PIETERSE C. M. J.; TON J.; VAN LOON L. C.; (2001) Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? **AgBiotechNet**, v. 3, p.1-8, 2001.

PINTO, N.F.J.A. **Vírus do mosaico comum da cana-de-açúcar em sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench): Caracterização de isolados, reação de cultivares e herança de resistência**. Tese de Doutorado. Piracicaba. ESALQ. 1984.

POLESANI, M.; DESARIO, F.; FERRARINI, A.; ZAMBONI, A.; PEZZOTTI, M.; KORTEKAMP, A.; POLVERARI, A. cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen

genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. **BMC Genomics**, London, v. 9, n. 142, 2008.

QUE Y. X.; YANG Z. X.; XU L. P.; CHEN, R. K. Isolation and identification of differentially expressed genes in sugarcane infected by *Ustilago scitaminea*," **Acta Agronomica Sinica**, v. 35, n. 3, pp. 452–458, 2009.

QUE Y. X.; LIN J. W.; SONG X. X.; XU L. P.; CHEN R. K. Differential Gene Expression in Sugarcane in Response to Challenge by Fungal Pathogen *Ustilago scitaminea* Revealed by cDNA-AFLP. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2011, Article ID 160934, 10 pages, 2011.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. Centre for Agriculture and Biosciences International. Cambridge. Cambridge University Press. 1994.

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

SOOSAAR, J. L. M.; BURCH-SMITH, T. M.; DINESH-KUMAR, S. P. Mechanisms of plant resistance to viruses. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 3, p. 789- 798, 2005.

STANGARLIN J. R.; PASCHOLATI S. F.; LABATE C. A.; Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira** 25:59-66, 2000.

TEAKLE, D. S.; SHUKLA, D. D.; FORD, R. E. **Sugarcane mosaic virus**. No. 342. In: AAB Descriptions of Plant Viruses. Wellesbourne, Warwick, UK. 1989.

THOKOANE, L. N.; RUTHERFORD, R. S. "cDNA-AFLP differential display of sugarcane (*Saccharum* spp, hybrids) genes induced by challenge with the fungal pathogen *Ustilago scitaminea* (sugarcane smut)," **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, vol. 75, pp. 104–107, 2001.

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.

UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. **Setor Sucreenergético – Histórico: Cultivo da Cana Hoje**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>> Acesso em: 15 novembro 2013.

URCUQUI-INCHIMA, S.; MAIA, I. G.; ARRUDA, P.; DRUGEON, G.; HAENNI, A.L.; BERNARDI, F. Deletion mapping of the potyviral helper componente-proteinase reveals two regions involved in RNA bilding. **Virology**, v. 268, p. 104-111, 2000.

USINA SÃO MARTINHO. **O Mercado Sucrealcooleiro**. Disponível em <<http://www.saomartinho.ind.br/>> Acesso em 16 de novembro de 2013.

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.

WANG J. P.; BUGHRARA, S. S. Detection of an Efficient Restriction Enzyme Combination for cDNA–AFLP Analysis in *Festuca mairei* and Evaluation of the Identity of Transcript-Derived Fragments. **Molecular Biotechnology**, v. 29, p. 211-220, 2005.

XIAO X.; LI H.; TANG, C.: A Silver-Staining cDNA-AFLP Protocol Suitable for Transcript Profiling in the Latex of Hevea. **Molecular Biotechnology**, v. 42, p. 91–99, 2009.

XIE, Y. D.; LI, W.; GUO, D.; DONG, J.; ZHANG, Q.; FU, Y.; REN, D.; PENG, M.; XIA, Y. The *Arabidopsis* gene *SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1* plays a role in the salicylate- and jasmonate-mediated defence responsespce. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 828–839, 2010.

YANG, Z. N.; MIRKOV, T. E. Sequence and relationships of sugarcane mosaic and sorghum mosaic virus strains and development of RT-PCR-based RFLPs for strain discrimination. **Phytopathology**, v. 87, p. 932-939, 1997.

ZVEREVA A. S.; POOGGIN, M. M. Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. **Viruses** 2012, v.4, p. 2578-2597, 2012.