

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**MODULAÇÃO DOS GENES DA NITRILASE E DO
RETROTRANSPONON EM CANA-DE-AÇÚCAR
SUBMETIDA A DÉFICIT HÍDRICO**

Anna Carolina Dal Ri Barbosa

Bióloga

JABOTICABAL – SP – BRASIL

Novembro - 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**MODULAÇÃO DOS GENES DA NITRILASE E DO
RETROTRANSPONSON EM CANA-DE-AÇÚCAR
SUBMETIDA A DÉFICIT HÍDRICO**

Anna Carolina Dal Ri Barbosa

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti

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).

JABOTICABAL – SP – BRASIL

Novembro de 2008

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANNA CAROLINA DAL RI BARBOSA - nascida no dia 24 de Setembro de 1980 na cidade de Brasília – DF, filha de Rubens de Arruda Barbosa Filho e Irene Dal Ri Barbosa. Formou-se bióloga pela Universidade de Araraquara – UNIARA. Durante a graduação trabalhou na área de Genética Animal no Projeto Genoma Camarão, sob a orientação do Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior na Universidade Federal de São Carlos onde posteriormente trabalhou durante um ano no Projeto Jovem Pesquisador – FAPESP intitulado “Isolamento e caracterização de microssatélites de *Prochilodus marggravii* (Characiformes, Prochilodontidae) para estudos de sua diversidade genética no rio São Francisco”, sendo bolsista de capacitação técnica FAPESP. Em Agosto de 2006 iniciou o mestrado na UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV) pelo Programa de Melhoramento Genético de Plantas.

*“Sou livre quando amo o que faço,
sou livre quando aceito que o mais
importante é a minha consciência,
sou livre quando na hora do
fracasso é sempre tempo de começar
outra vez. Sou livre quando sou
capaz de amar o instante de vida
que tenho nas mãos.” (Fernando
Pessoa)*

A minha mãe amada Irene Dal Ri Barbosa pelo amor incondicional, pelo incentivo e por sempre confiar em mim. Meu anjo "sem asas", exemplo de força, garrá e superação. Amo você.

Ao meu querido pai Rubens de Arruda Barbosa Filho o qual sempre abriu mão de seus sonhos para a realização dos nossos. Meu exemplo de honestidade dedicação e coragem. Amo você.

OFEREÇO

Aos meus irmãos Cássio, Flávia e Fabiana e cunhados Patrícia e Cristiano e sobrinhas Stella e Beatriz, meu maior tesouro, minha família.

COM CARINHO

Ao Meu Coração, meu amor Fabrício Belini pelo companheirismo compreensão e amizade, deixo aqui declarado meu eterno amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti pela orientação, confiança e apoio para realização desse trabalho.

A Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin e Prof. Dr. Manoel Victor F. Lemos pelos conselhos e considerações dados para o meu artigo no exame de qualificação.

A Profa. Dra. Janete Desidério Sena e Dra Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva por aceitarem participar da minha banca examinadora de defesa.

A Profa. Maria Inês Tiraboschi Ferro, pelo carinho, pela força, pelas palavras de conforto e incentivo, pelos bons conselhos nas horas difíceis e também por me abrir as portas do laboratório para a realização das extrações de RNA.

À UNESP/Jaboticabal, ao ex-coordenador Prof. Dr. Rinaldo Cesar de Paula e ao atual coordenador Prof. Dr. Dilermando Perecin e demais professores do Programa de Pós-Graduação (Genética e Melhoramento de Plantas) pela importante contribuição no aperfeiçoamento de minha formação profissional.

A todos os amigos e colegas do LBM que participaram direta e indiretamente na realização do meu trabalho.

A Agda Paula Facincani e Daniela Jovino pelo seqüenciamento de minhas amostras. Obrigada por sempre “quebrarem meus galhos”.

A Elaine Costa, pela amizade e importante ajuda no desenvolvimento da técnica de Southern blot. Obrigada amiga, pelas madrugadas comigo no LBM.

As “meninas” do LBM, Dani, Agda, Gisele, Juliana Vantini, Karina, Elaine, Renata, Mariana e Flavinha pelas longas conversas, palavras de incentivo e força que foram essenciais para a conclusão do meu trabalho.

A Mariza Motta pela companhia nos dias de trabalho e pelas nossas longas conversas.

Ao meu amigo e companheiro de bancada Nilson Nicolau Jr., pelas técnicas realizadas juntos, sempre com persistência e garra. Obrigada por nunca me negar ajuda.

A Giselle minha grande amiga, irmã e companheira. Obrigada amiga por sempre me apoiar, me incentivar e me ajudar em todos os momentos. Você é uma amiga e tanto.

A Camila (Maritaka) minha mais nova amiga. Obrigada por ser sempre sincera e pelas palavras de conforto nos momentos difíceis.

A todas as minhas outras amigas especiais: Grazielle, Michelle, Kelen e Patrícia que mesmo fora de meu ambiente de trabalho, mais que direta e indiretamente me apoiaram, incentivaram dando força. Obrigada meninas.

A minha família amada e querida pelo apoio incondicional. Obrigada por estar sempre presente em minha vida.

De maneira muito especial agradeço meu amigo, amado e amante Fabricio Belini, por ser sempre meu porto-seguro nos momentos difíceis, me inspirando e estimulando a cada novo dia. Obrigada por me reerguer nos momentos em que pensei fraquejar. Te amo.

A FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO	xii
SUMMARY.....	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVO.....	3
III. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 A cultura da cana-de-açúcar.....	4
3.2 O estresse hídrico.....	7
3.3 ESTs – Projetos para a obtenção em plantas.....	9
3.4 RT-PCR semiquantitativo.....	11
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Instalação do experimento.....	13
4.2 Coleta das amostras.....	13
4.3 Extração do RNA total.....	14
4.3.1 Quantificação do RNA total.....	14
4.3.2 Análise da integridade do RNA total.....	15
4.4 Síntese da primeira fita de cDNA.....	15
4.5 Extração de DNA Plasmidial.....	16
4.6 Sequenciamento dos clones.....	17
4.6.1 Reação de PCR.....	17
4.6.2 Precipitação da reação de sequenciamento.....	17
4.7 Reação de RT-PCR semiquantitativo.....	18
4.8 Southern Blotting.....	19
4.9 Bioinformática.....	19
V. RESULTADOS.....	21

5.1 Extração do RNA.....	21
5.2 Identificação das seqüências de aminoácidos das ESTs.....	25
5.3 Expressão dos genes.....	28
VI. DISCUSSÃO.....	32
VII. CONCLUSÕES.....	35
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Eletroforograma de gel de agarose (1.5%) em condição denaturante das amostras de RNA do cultivar SP90-1638.....	21
Figura 2. Eletroforograma de gel de agarose (1.5%) em condição denaturante das amostras de RNA do cultivar SP83-2847.....	22
Figura 3. Resultado da amplificação por RT-PCR do clone SCJFLR2036B11 na variedade sensível de cana-de-açúcar.....	22
Figura 4. Resultado da amplificação por RT-PCR do clone SCJFLR2036B11 na variedade tolerante de cana-de-açúcar.....	23
Figura 5. Resultado da amplificação por RT-PCR do clone SCBFLR1005E12 na variedade sensível de cana-de-açúcar.....	23
Figura 6. Resultado da amplificação por RT-PCR do clone SCBFLR1005E12 na variedade tolerante de cana-de-açúcar.....	23
Figura 7. Resultado da amplificação por RT-PCR do gene actina em amostras foliares da variedade sensível de cana-de-açúcar.....	24
Figura 8. Resultado da amplificação por RT-PCR do gene actina em amostras foliares da variedade tolerante de cana-de-açúcar.....	24
Figura 9. Seqüência de aminoácidos gerados pela tradução da seqüência do clone SCJFLR2036B11.....	27
Figura 10. Seqüência de aminoácidos gerados pela tradução da seqüência do clone SCBFLR1005E12.....	28

Figura 11(A). Análise da expressão relativa do clone SCJFLR2036B11 em plantas controle e estressada no cultivar sensível.....	30
Figura 11(B). Análise da expressão relativa do clone SCJFLR2036B11 em plantas controle e estressada no cultivar tolerante.....	30
Figura 12(A). Análise da expressão relativa do clone SCBFLR1005E12 em plantas controle e estressada no cultivar sensível.....	31
Figura 12(B). Análise da expressão relativa do clone SCBFLR1005E12 em plantas controle e estressada no cultivar sensível.....	31

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Iniciadores usados no seqüenciamento (*) e RT-PCR dos clones SCJFLR2036B11 e SCBFLR1005E12.....	25
Tabela 2. Similaridade do clone SCJFLR2036B11 de cana-de-açúcar com de genes de outros organismos obtidas pelo BlastX.....	26
Tabela3. Similaridade do clone SCBFLR1005E12 de cana-de-açúcar com de genes de outros organismos obtidas pelo BlastX.....	26

MODULAÇÃO DOS GENES DA NITRILASE E DO RETROTRANSPONON EM CANA DE AÇÚCAR SUBMETIDA A DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO – A seca é um dos principais fatores abióticos que afetam a produtividade das plantas. Para detectar os genes expressos sob condições de deficiência hídrica desenvolveu-se uma análise da expressão gênica das plantas de cana-de-açúcar de uma cultivar tolerante (cv. SP83-2847) e outra sensível (cv. SP90-1638) à seca, utilizando macroarranjos de DNA para monitorar a expressão gênica de 3.575 clones de folhas de cana-de-açúcar e, a partir dos resultados obtidos foram selecionados dois ESTs (SCJFLR2036B11 e SCBFLR1005E12) que se apresentaram como diferencialmente expressos nas duas cultivares. Os clones foram seqüenciados e identificados e correspondem ao gene que codifica para a Nitrilase e para elementos genéticos móveis (Retrotransposon). Os dados de expressão gênica foram validados por meio de RT-PCR semiquantitativo e Southern blotting e a seqüência de nucleotídeos obtida foi utilizada nas buscas em bancos de dados e na comparação de seqüência o que contribuiu para a atribuição de função biológica. O gene similar ao da Nitrilase apresentou-se induzido tanto na situação de deficiência hídrica no cultivar sensível (SP90-1638) como no cultivar tolerante (SP83-2847) nas plantas não expostas ao déficit hídrico. O gene que codifica um elemento genético móvel (Retrotransposon) apresentou-se induzido no cultivar tolerante na situação controle em detrimento da situação estressada e invariável para cultivá-lo sensível nas duas situações.

Palavras-Chaves: Déficit hídrico, ESTs, Expressão Gênica, Nitrilase, Retrotransposon.

NITRILASE AND RETROTRANSPOSON GENE MODULATION IN SUGARCANE PLANTS SUBMITTED TO WATER DEFICIT

SUMMARY – Drought is one of the main abiotic stresses which affect plant productivity. To detect genes expressed under drought conditions, a gene expression study of sugarcane plants was performed, with drought tolerant (cv. SP83-2847) and sensitive (cv. SP90-1638) cultivars, using DNA macroarrays to monitor gene expression of 3.575 sugarcane leaf clones, and from the obtained results two ESTs (SCJFLR2036B11 and SCBFLR1005E12) identified as differentially expressed in both cultivars were selected. The clones were sequenced and identified as the gene which codifies Nitrilase and mobile genetic elements (Retrotransposon). Gene expression data were confirmed by Semiquantitative RT-PCR and Southern blotting analysis, and the obtained nucleotide sequence used in database searches and in sequence comparisons, which contributed for the biological function attribution. The gene similar to Nitrilase appeared to be induced under water deficiency in the sensitive cultivar (SP90-1638) as well as in the tolerant cultivar (SP83-2847) in plants not submitted to water deficit. The gene which codifies a mobile genetic element (Retrotransposon) appeared to be induced in the tolerant cultivar under the controlled condition in detriment of the stress, and unchanged for the sensitive cultivar under both conditions.

Keywords: Water deficit, ESTs, Gene Expression, Nitrilase, Retrotransposon.

I. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma planta alógama da família Poaceae pertencente ao gênero *Saccharum* e originária do sudoeste da Ásia, região central de Nova Guiné e Indonésia. Considerada uma das dez mais importantes culturas mundiais, contribui com cerca de 60% a 70% de todo o açúcar produzido no globo e apresenta uma das maiores produções de biomassa entre as espécies cultivadas (INGELBRECHT *et al.* 1999). Sua importância econômica justifica-se pelos produtos gerados após seu processamento. Estes produtos compreendem, além do açúcar, o álcool hidratado, a aguardente, a garapa (fonte direta de energia para os organismos), o bagaço (utilizado como fonte de energia pelas usinas), a vinhaça, que é usada na produção de rações, fertilizantes, cera e melado (THIAGO e VIEIRA, 2002). Além do grande aproveitamento, este sistema agrícola também apresenta relevante caráter social, através da geração de empregos diretos e indiretos.

O Brasil apresenta a maior produção mundial de cana-de-açúcar, distribuída nas regiões Centro-Sul e Nordeste. Um dos pontos de vital importância na expansão da cultura e aumento da produtividade em um país de dimensões continentais como o Brasil é o desenvolvimento de cultivares adaptadas para as diferentes condições climáticas e de solo (NEPOMUCENO, 2001).

Dentre as adversidades climáticas às quais as plantas estão expostas, o estresse hídrico representa uma situação ambiental muito importante que pode prejudicar o crescimento e desenvolvimento das plantas, e conseqüentemente o rendimento da cultura (RODRIGUES, 2004).

A cultura da cana-de-açúcar necessita de dois ciclos distintos durante seu plantio. No primeiro deles, a fase vegetativa, o mais importante, e limitante, é a disponibilidade de água no solo para o crescimento da planta. Na fase de maturação é de extrema importância a existência de um período seco, o que ocasiona uma redução do crescimento para que haja o acúmulo de sacarose. Porém, este período de seca não deve ultrapassar essa fase, para que o crescimento da planta não seja comprometido. Após a maturação, o teor de açúcar observado representa aproximadamente um terço

da matéria seca dos colmos (INMAN-BAMBER & SMITH 2005). Geralmente, as plantas não suportam longos períodos de seca, apresentando um crescimento limitado. Plantas que sobrevivem e mantêm seu crescimento e/ou desenvolvimento sob condição limitada de água, durante prolongados períodos de estiagem, são consideradas tolerantes, ao contrário das plantas sensíveis, incapazes de responder adequadamente ao estresse hídrico. Estas respostas de defesa da planta dependem do tempo de duração e da severidade do estresse hídrico, além da ação conjunta com outros estresses abióticos, como o frio e temperaturas elevadas, ao qual a planta também possa estar submetida (BRAY *et al.* 2000).

Frente à dificuldade de se trabalhar com o complexo genoma da cana, a geração de um banco de 237.954 ESTs (Etiquetas de Seqüências Expressas) durante o projeto SUCEST (VETTORE *et al.* 2001), possibilitou um incremento nos estudos moleculares envolvendo genes específicos de cana-de-açúcar. O estudo destas seqüências gerou uma ampla quantidade de dados que podem ser utilizados para a compreensão de vias metabólicas e um conjunto de processos biológicos importantes, que podem ser usados no melhoramento genético e no aperfeiçoamento de cultivares de cana-de-açúcar.

Os resultados obtidos da análise de membranas de alta densidade (macroarranjo), contendo genes de cana-de-açúcar hibridizadas com RNA extraído de amostras foliares de cultivares contrastantes SP90-1638 (sensível) e SP83-2847 (tolerante) para o caráter tolerância ao estresse, possibilitaram a identificação de ESTs diferencialmente expressos quando as plantas foram submetidas a diferentes períodos de estresse hídrico (24, 72 e 120 h de supressão de rega) (RODRIGUES, 2004). Contudo, o presente trabalho teve como objetivo validar os dados de expressão oriundos dos experimentos de macroarranjos, por meio de RT-PCR semiquantitativo e Southern blot. A seqüência de nucleotídeos obtida foi utilizada nas buscas em bancos de dados e na comparação de seqüência o que contribuiu para a atribuição de função biológica.

II. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e analisar a expressão gênica diferencial por meio de RT-PCR semiquantitativo e Southern blot, de dois genes de cana-de-açúcar (SCJFLR2036B11 e SCBFLR1005E12) identificados em experimentos de macroarranjo, submetidas à condição de déficit hídrico.

III. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A cultura da cana-de-açúcar

Segundo muitos historiadores, possivelmente a cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) se originou na Papua Nova Guiné. Mesmo sendo difícil definir com exatidão sua origem geográfica, há um consenso entre os especialistas sobre o surgimento da planta no continente asiático. Posteriormente a planta foi introduzida na China, onde o açúcar cru já era produzido, e então foi disseminada para a Índia, Egito, Marrocos, sul da Espanha, até chegar à Ilha da Madeira, Ilhas Canárias, Cabo Verde e Açores. A partir da introdução da cana-de-açúcar na Índia o açúcar começou a ser comercializado. O produto era então considerado um artigo luxuoso, o que lhe agregava muito valor como moeda de troca entre os povos. Segundo relatos dos povos hindus, para a produção do 'açúcar' o colmo da planta era esmagado e fervido, o que resultava no melaço da cana-de-açúcar. A implementação do cultivo da planta pelos árabes possibilitou a grande expansão da comercialização do açúcar, entretanto, os preços exorbitantes que eram impostos desencadeou um interesse imediato dos europeus pelo cultivo da planta. (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2008a).

No Brasil, oficialmente, foi Martim Afonso de Souza que em 1532 trouxe a primeira muda de cana ao Brasil e iniciou seu cultivo na Capitania de São Vicente. Lá, ele próprio construiu o primeiro engenho de açúcar. Mas foi no Nordeste, principalmente nas Capitanias de Pernambuco e da Bahia, que os engenhos de açúcar se multiplicaram (MATSOUKA *et al.* 1999).

À medida que o interesse pelo principal produto da cana-de-açúcar aumentava, técnicas de produção mais eficientes eram desenvolvidas. O domínio lusitano do mercado de açúcar influenciou os investimentos da Espanha na produção da cana-de-açúcar em Cuba, a qual passou a concorrer diretamente com o Brasil. Paralelamente, a Inglaterra também aplicava recursos para a produção da cultura na Jamaica, Antilhas e Barbados, cujas inovações tecnológicas, como o uso do bagaço como fonte comburente, foram essenciais para o sucesso da produção e consolidaram a Inglaterra

como um próspero concorrente no mercado mundial de açúcar (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2008a).

Posteriormente, a produção de açúcar a partir de beterraba tornou-se prevacente na Europa em detrimento ao uso do açúcar de cana-de-açúcar, devido a questões políticas que dificultavam a importação do produto. Nesse contexto, Cuba assumiu a liderança do mercado, e o Brasil, que ainda utilizava técnicas de produção ultrapassadas, foi sobrepujado por outros países e perdeu sua colocação no mercado mundial como grande produtor de açúcar. Entretanto, a substituição do modelo de produção por tecnologias automatizadas, como a adoção do processo de centrifugação em usinas, possibilitou obter um maior rendimento com a produtividade da cultura. Em meados dos anos 70, impulsionado pela crise do abastecimento mundial de petróleo, o Brasil passa a investir na produção de álcool combustível (JUNQUEIRA, 2006).

Atualmente, as variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil são o resultado de cruzamentos interespecíficos entre *Saccharum officinarum*, *S. barbieri*, *S. sinense* e as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum*. A cana-de-açúcar apresenta um dos genomas mais complexos do reino vegetal, com um número diplóide de cromossomos que varia entre 70-120 (D'HONT *et al.* 1996). Devido a esta complexidade encontram-se muitas dificuldades na aplicação de técnicas convencionais de melhoramento genético para a cultura visando o desenvolvimento de novas cultivares com maior produtividade e tolerância a estresses bióticos e abióticos (HOGARTH, 1987).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo ela, uma grande fonte de riquezas para a economia brasileira desde os tempos do Brasil colônia. Além da produção de açúcar, a indústria canavieira brasileira, mantém o maior sistema de produção de energia comercial da biomassa no mundo, através do etanol e do uso quase total do bagaço. Existe a perspectiva de se utilizar a cana-de-açúcar como biorreator na geração de energia elétrica, bem como na produção de plásticos biodegradáveis, açúcares não calóricos e compostos químicos de interesse farmacêutico (SOUZA e SILVA, 2002).

Dados mostram somente no Brasil na safra de 2007/08 foram colhidos 431,2 milhões de toneladas, com uma estimativa de 16% de aumento para a safra futura. Além da importância econômica, o caráter social também é muito significativo, pois o trato desta cultura emprega cerca de 1.000.000 empregos diretos e indiretos nas 350 indústrias de açúcar e álcool de todo o Brasil (BRASIL, 2007), o que evidencia a importância social da cultura, além de gerar divisas através da exportação de açúcar e álcool e apresentar um aproveitamento racional da biomassa vegetal, gerando energia elétrica e produtos para a indústria álcoolquímica e para alimentação animal entre outros (SACILOTO, 2003).

Segundo o Instituto Economia Agrícola (IEA, 2000), a produção da cana-de-açúcar fica na dependência dos atributos dos solos em que são cultivados e da tecnologia adotada, embora as flutuações anuais na produção estejam principalmente ligadas às oscilações climáticas, em especial, a precipitação pluvial.

A fase de maturação da cana-de-açúcar se dá por completa quando o potencial de acúmulo de sacarose é alcançado, sendo esta característica intrínseca para cada variedade. Em virtude de suas características de maturação serem sazonais, a indústria extrai o caldo no período de melhor maturação de suas variedades, ou seja, no período mais seco do ano (DOS SANTOS, 2007).

De acordo com MATSUOKA (1996), em meados do século passado os canaviais do mundo todo passaram a apresentar graves problemas fitossanitários, com elevadas perdas de produção e, com isso, muitas indústrias foram à falência. Em virtude disso, e do conhecimento das leis da genética aliada à descoberta de que a cana produzia sementes, começaram os esforços para o melhoramento genético da cana-de-açúcar.

Atualmente, os programas de melhoramento genético com cana-de-açúcar são desenvolvidos em diferentes países, por instituições públicas e privadas, ou em sistemas cooperativos formados por produtores. Esses empreendimentos são onerosos, e os resultados obtidos de longo prazo, chegando a mais de 15 anos (CESNIK, 2004).

No Brasil, os programas de melhoramento genético foram, inicialmente criados por produtores curiosos, no início do século passado. Em 1972 foi criado o Programa

Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar (PLANALSUCAR), o qual após sua extinção em 1990, passou a ser conduzido pelas Universidades Federais que compõe a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA). Atualmente a RIDESA é composta por sete Universidades Federais. Existem no Brasil quatro programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar, sendo eles: RIDESA (RB), Coopersucar (SP-CTC), Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e, o mais recente deles, CANAVIALIS (CV) (DOS SANTOS, 2007).

3.2 O estresse hídrico

A terminologia 'estresse' pode ser definida como um desvio das condições adequadas para o crescimento e desenvolvimento da planta, que induzem a mudança e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis a princípio, podendo se tornar permanente. O 'estresse hídrico' é muito utilizado para designar uma condição abiótica desvantajosa (LARCHER, 2004). Geralmente este termo está relacionado à escassez de água ou eventos naturais de seca à qual a planta está sujeita.

Entretanto, este conceito também pode estar relacionado ao estresse por excesso de água, que desencadeia na planta uma deficiência de oxigênio. Assim, o termo déficit hídrico torna-se mais adequado para uma referência ao estresse por falta de água (LOCY *et al.* 2006).

O estresse hídrico é considerado um fator de extrema importância quando se trata do aumento da produtividade da cultura da cana-de-açúcar, as plantas podem ser afetadas se no ambiente contiver excesso ou deficiência na quantidade ou qualidade da água disponível para suprir as necessidades básicas da planta (TAIZ e ZEIGER, 2004).

No Brasil, dentre todos os fatores bióticos e abióticos, o estresse hídrico é o que freqüentemente mais influencia de forma negativa a produtividade da cana-de-açúcar. Assim, seus efeitos nas plantas incluem redução nas taxas de assimilação de CO₂, tamanho das células foliares, taxa de transpiração, potencial de água na planta, taxa de crescimento e abertura estomática (HSIAO, 1973; TAIZ e ZEIGER, 2004). A maioria das

regiões canavieiras do país apresenta um volume adequado de chuvas para a cultura, estimado entre 1200 e 1500 mm anuais (OMETO, 1980, BULL, 2000). Entretanto, o mais importante é a distribuição pluviométrica, uma vez que esta é bastante irregular. De acordo com Doorenbos e Kassan (1979), períodos com precipitação inferior a 50 e 60 mm são considerados períodos de déficit hídrico. Em anos com distribuição irregular de chuvas, como na safra 1999/2000, ocorreram perdas de até 20% (IEA, 2000). Em 2005 em decorrência da estiagem, o Estado do Paraná apresentou quebra na safra de cana-de-açúcar de 16%, ou uma perda de cerca de 4 milhões de toneladas para o setor (ALCOPAR, 2005).

A raiz da planta é considerada o primeiro órgão a detectar variações no conteúdo de água disponível no solo. Com a percepção da deficiência hídrica, as raízes podem sinalizar para o fechamento dos estômatos, cuja condutância estomática está diretamente relacionada com o status hídrico do solo (LOCY *et al.* 2006). Como resposta à deficiência hídrica, o crescimento da raiz primária é estimulado, possivelmente regulado pelo aumento do conteúdo de ABA, que também é relacionado na sinalização entre os tecidos (SHARP *et al.* 2004).

A reação do fechamento estomático ocorre mesmo antes de haver diminuição do conteúdo de água da folha (YORDANOV *et al.* 2000). O principal objetivo do fechamento estomático é evitar a cavitação e uma falha do sistema de condução de água (ao invés de objetivar apenas a reposição das perdas de água pela transpiração), tendo em vista que os estômatos podem se fechar como resposta direta ao aumento da tensão de água no xilema (KRAMER e BOYER, 1995).

Em termos celulares, as plantas sob déficit hídrico apresentam uma diminuição do volume celular, um aumento na concentração e uma progressiva desidratação do protoplasma, sendo que, a primeira e mais sensível resposta é a diminuição do processo de crescimento, particularmente, do crescimento em extensão (LARCHER, 2004). Considerando os níveis moleculares o sinal de estresse produzidos pela célula, ativa uma rota de transdução que envia esta mensagem aos fatores de transcrição, que regulam a expressão dos genes encarregados da resposta ao estresse. Os genes expressos em resposta à seca podem ser divididos em dois grupos. O primeiro codifica

proteínas que aumentam a tolerância ao estresse como proteínas de canais de água, transportadores e enzimas detoxificantes. O segundo grupo inclui diferentes proteínas com função regulatória tal como fatores de transcrição, quinases, fosfatases e enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios e na biossíntese do ABA (KARIM, 2007). Os genes expressos durante o estresse promovem tolerância celular à desidratação através ações protetoras no citoplasma, alteração no potencial hídrico, para promover a captação de água, controle da acumulação de íons e também a própria regulação da expressão gênica (BRAY, 1993).

3.3 ESTs – Projetos para a obtenção em plantas

Seqüências expressas (ESTs – *Expressed Sequence Tags*) são obtidas a partir do sequenciamento do DNA complementar (cDNA) derivado da transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA) de um organismo, tecido ou ainda de um único tipo celular. São caracterizadas por serem seqüenciadas uma única vez (*single-pass*) e por esse motivo, incompletas. Ou seja, geralmente são pequenas, com cerca de 600 pares de base (pb), e contém seqüências parciais do mRNA de origem. Uma vez seqüenciadas as várias ESTs, torna-se possível a análise funcional dessa informação, não só para a identificação dos genes de interesse, mas também para conhecer o padrão de expressão gênica em diferentes condições ambientais (BARSALOBRES, 2004).

Durante o seu ciclo de vida, as plantas são constantemente bombardeadas por sinais ambientais e uma resposta adequada a cada um desses sinais é determinante para sua sobrevivência e para sua produção máxima. Essas respostas podem ser fisiológicas, bioquímicas, morfológicas ou de desenvolvimento, e estão sendo hoje o foco de importantes estudos relacionados a transdução de sinal. (SACIOLOTO, 2003).

As investigações dos mecanismos de integração de todos os sinais levaram à identificação de vários hormônios que agem na planta de uma maneira tanto local quanto sistêmica, alterando o padrão de expressão de genes responsáveis por efetuar as mudanças necessárias à resposta de sinais ambientais. Segundo Souza *et al.* (2001), foi estimado que de 7% a 15% dos genes de um organismo codificam para

proteínas envolvidas na transdução de sinal. Mais de 900 ESTs já foram relacionados com diferentes vias de transdução de sinal em cana-de-açúcar. Essas proteínas estão relacionadas ao complexo sistema de sinalização que as plantas desenvolveram ao longo da sua evolução o que permite a adaptação à vasta gama de condições ambientais através da sinalização de hormônios.

No Brasil, a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (COPERSUCAR), financiaram o projeto de obtenção de ESTs de cana-de-açúcar (SUCEST - Sugarcane EST Project). Neste projeto, 26 bibliotecas de cDNA foram construídas a partir da extração de RNA total de várias fontes: calos, raízes, diferentes estágios de folhas, colmos, plantas infectadas com patógenos, etc. (VETTORE *et al.* 2001). Mais de 237.000 ESTs foram obtidas resultando em 43.141 clusters, que são agrupamentos das ESTs de acordo com o alinhamento das seqüências consenso (no sentido 5' – 3'). (TELLES *et al.* 2001).

Diversos organismos de interesse científico e/ou econômico têm sido investigados através de ESTs. Em tomate (*Lycopersicon esculentum*), organismo utilizado como modelo para diversos estudos relacionados à biologia das plantas, foram obtidas mais de 150.000 ESTs a partir de 26 bibliotecas de cDNA (HOEVEN *et al.*, 2002). Estas seqüências estão sendo utilizadas para a identificação de genes específicos a tecidos e fases do desenvolvimento, e também para identificar genes expressos em resposta aos estresses bióticos e abióticos. Uma vez identificadas, estas seqüências passam a compor a base de dados de ESTs do tomate no “The Institute for Genomic Research” (TIGR, <http://www.tigr.org/tab/tgi/lgi/>) (BARSALOBRES, 2004).

Com os mesmo objetivos, as empresas North Central Soybean Research e United Soybean Board subsidiaram o projeto para a soja. O objetivo do programa foi gerar mais de 200.000 ESTs, representando genes expressos em diversos tecidos, órgãos e condições ambientais. Para esta espécie, aproximadamente 65 bibliotecas de cDNA foram criadas (MAGUIRE *et al.* 2002).

Existem também projetos para obtenção de ESTs em Arabidopsis, trigo, milho e arroz, entre outras plantas. O número de ESTs conhecido para estes organismos,

segundo o banco de dados de ESTs do National Center for Biotechnology Information - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) é de mais de 188.000 ESTs para *Arabidopsis*, 499.000 para trigo, 360.000 para milho e 260.000 para arroz.

Segundo o trabalho de Carson e Botha (2000) foi feito uma análise preliminar de ESTs de cana-de-açúcar. Os autores apontaram informações úteis sobre as seqüências gênicas de cana-de-açúcar. Duzentos e cinquenta clones oriundos de folhas, foram selecionados aleatoriamente e seqüenciados na extremidade 5' do fragmento. Destes clones, 24% foram tidos como novas seqüências gênicas. Estes resultados apresentaram uma aplicação bem sucedida da análise de ESTs e forneceram uma indicação da expressão de genes no tecido foliar.

No trabalho de Ma *et al.* (2003), 9.216 clones de cana-de-açúcar, provenientes de três bibliotecas de cDNA do ápice floral, folhas e internos maduros foram sequenciadas até a extremidade 5'. Estas seqüências aumentaram o número de depósitos de ESTs de cana-de-açúcar no *GenBank* em aproximadamente 8 vezes, aumentando de 992 para 8.985 apenas no ano de 2003, sendo que as ESTs prévias foram oriundas dos trabalhos de CARSON e BOTHA (2000), CARSON e BOTHA (2002) e CARSON *et al.* (2002). Estas ESTs foram comparadas com base de dados de dados do SUCEST (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br>) e um total de 302 seqüências eram ausentes neste banco, sugerindo, de acordo com os autores, que estas diferenças podem ser devidas a fatores ambientais.

A partir da publicação do trabalho de VETTORE *et al.* (2003) a base de dados do SUCEST foi adicionada ao GenBank, aumentando o número de ESTs descritas de cana-de-açúcar a 246.301.

3.4 RT-PCR semiquantitativo

Muitas vezes uma análise qualitativa da expressão do RNA não é suficiente para responder a pergunta dos pesquisadores, mas sim, uma análise onde se detecte a variação dos níveis de expressão em diferentes condições experimentais (MARONE *et al.* 2001). A reação em cadeia da polimerase (PCR) afetou drasticamente os estudos

moleculares, simplificando as tarefas laboratoriais e permitindo o avanço na identificação de genes novos e na quantificação de seqüências específicas de nucleotídeos (ERLICH *et al.* 1991). Atualmente, estratégias como a transcrição reversa associada à reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) vêm contribuindo para estudos de expressão através de cDNAs produzidos pela ação da transcriptase reversa sobre o RNA. O RT-PCR semiquantitativo é uma técnica, rápida, altamente sensível e útil para a detecção de transcritos raros e na análise de pequenas quantidades de amostra (CARDING *et al.* 1992).

Além do RT-PCR semiquantitativo outros dois métodos, “Northern blotting” e RT-PCR quantitativo (QRT-PCR), são usados na quantificação de transcritos. O método “Northern blotting” muito embora seja muito preciso, requer maiores quantidades de RNA total e consome muito tempo (FREEMAN *et al.*, 1999), já o QRT-PCR é o método mais avançado na quantificação de transcritos e mais eficiente que o RT-PCR, porém é o mais oneroso.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalação do experimento

O experimento foi instalado em casa de vegetação do departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP, com temperatura e umidade controlada (regime de dia e noite). Foram utilizadas duas cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*), sendo uma classificada como tolerante ao déficit hídrico cv SP83-2847 (COPERSUCAR, 2003) e a outra sensível cv SP90-1638 (COPERSUCAR, 1999). A classificação de tolerância e sensibilidade para os cultivares é proveniente de estudos realizados no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e se basearam no comportamento fisiológico e na produtividade das cultivares em experimentos de campo. Os toletes foram cultivados durante 39 dias em bandejas com regas periódicas. Após este período as plântulas foram transplantadas para vasos de 10L contendo solo Latossolo Vermelho esterilizado.

A disposição dos vasos na casa de vegetação obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado. Para cada cultivar foram transplantadas 18 plantas divididas em dois tratamentos (plantas com irrigação e sem irrigação) em três repetições.

4.2 Coleta das amostras

Após 56 dias de cultivo na casa de vegetação, iniciou-se a supressão de irrigação para a coleta das folhas das plântulas dos cultivares de cana-de-açúcar. Foram coletadas as plantas submetidas à supressão de rega, e as plantas controle, que continuaram sob irrigação diária. As amostras foram coletadas nos primeiros dias de supressão da rega sendo a primeira coletada no primeiro dia, 24 horas após a última rega (T1). Foram coletadas seis amostras de cada cultivar, totalizando 12 amostras/amostragem. O segundo ponto de coleta compreende 72 horas de tratamento experimental (T2) e o terceiro ponto compreende 120 horas (T3). As amostras foram congeladas, imediatamente, em nitrogênio líquido e depois armazenadas em ultrafreezer (-86°C).

4.3 Extração do RNA total

Para a extração do RNA total de folha de cana-de-açúcar foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen) e o procedimento sugerido pelo fabricante. Os materiais utilizados nas extrações foram devidamente tratados com água deionizada contendo dietil pirocarbonato (DEPC) (0,01% v/v) e esterelizados por duas horas a 180°C, com o intuito de evitar a presença de RNases (SAMBROOK *et al.* 1989)

Foram realizadas extrações de RNA total de 18 amostras de folhas de cana-de-açúcar das cultivares SP90-1638 (sensível) e SP83-2847 (tolerante). Para cada amostra de folha foram utilizados 1,2 g de tecido vegetal, que foi macerado em nitrogênio líquido até sua completa pulverização e posteriormente homogeneizado em 8,0 ml de reagente TRIZOL. Após o período de incubação de 5 minutos em temperatura ambiente, adicionaram-se às amostras 1,6 ml de clorofórmio. Após a agitação mecânica e vigorosa incubou-se as amostras por 3 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos à temperatura de 4°C. Após a centrifugação a fase superior foi recuperada e transferida para tubos estéreis de 1,5ml. Para cada 900 µl de amostra foram acrescentados 540 µl de álcool isopropílico. Para a precipitação do RNA a solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente foi realizada uma nova centrifugação por 10 minutos a 12.000 x g à 4°C, e após o descarte do sobrenadante, as amostras foram lavadas com 1ml de álcool etílico 75%. O precipitado foi então ressuspenso e centrifugado a 7.500 x g durante 5 minutos à 4°C. Foram realizadas mais duas lavagens e então o RNA total foi ressuspenso em água DEPC (livre de RNase) e armazenado a -86°C.

4.3.1 Quantificação do RNA total

O RNA total de cada amostra foi estimado e avaliado quanto ao grau de pureza em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific), onde 1,5 µl de cada amostra foi analisado. As medidas de absorvância foram realizadas nos comprimentos de onda de

260 e 280 nm, cuja relação 260/280 fornece uma estimativa da pureza do ácido nucléico (SAMBROOK *et al.* 1989)

4.3.2 Análise da integridade do RNA total

Com o intuito de verificar a integridade das amostras de RNA, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose denaturante 1,5% (p/v), (1,2 de agarose; 8,0 ml de tampão de corrida 10X, composto de Mops 20 mM pH 7.0, acetato de sódio 50 mM e EDTA 5mM; 65 ml de água tratada com DEPC; 6,4 ml de formaldeído), por 40 minutos à 77 V constante. O gel foi analisado e fotografado em transiluminador utilizando um sistema de documentação Kodak Edas 120.

4.4 Síntese da primeira fita de cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA para ser utilizada nos experimentos de RT-PCR foram adotados procedimentos com base no método descrito por SCHUMMER *et al.* (1999). As primeiras fitas de cDNA foram individualmente produzidas para cada uma das 18 amostras de RNA total extraídas de cada cultivar.

As amostras foram tratadas com DNase I (kit Invitrogen) para evitar contaminação de DNA nas análises posteriores. Para tal tratamento foram adicionados a um tubo de 0,5 ml: 1 µg de RNA; 1µl de tampão de reação de DNase I (10x); 1 µl de DNase I 1U/µl e água tratada com DEPC q.s.p. para 10 ml. Incubou-se a mistura por 15 minutos a temperatura ambiente e posteriormente inativou-se a DNase I através da adição de 1 µl de EDTA 25 mM e aquecimento por 10 minutos a 65°C.

No processo de preparo do cDNA foi utilizado o kit da enzima SuperScript III (Invitrogen). Para a transcrição reversa foram adicionados a um tubo de microcentrifuga, os seguintes reagentes: 1 µl de oligo(dT)₁₂₋₁₈; 1 µg de RNA (11 µl advindos do tratamento com DNase I) e 1 µl de mix de 10 mM de dNTP. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e em seguida incubada em gelo por 1 minuto. Posteriormente adicionou-se a mistura 4 µl de tampão First-Strand (5X); 1 µl de DTT 0,1

M; 1 µl de RNase OUT (inibidor de RNase) e 1 µl de SuperScript III RT (200 unidades/µl). A mistura foi incubada por 60 minutos a 50°C e a reação inativada aquecendo as amostras por mais 15 minutos a 70°C. As amostras de cDNA prontas foram armazenadas a -86°C.

4.5 Extração de DNA Plasmidial

Os dois clones estudados SCJFLR2036B11 (CA128282.1) e SCBFLR1005E12 (CA117342.1), oriundos das bibliotecas de cartucho produzidas no projeto SUCEST, (VETTORE *et al.* 2001), foram adquiridos no banco de clones do BCCCenter na forma de cultura de bactérias em meio sólido. Esses clones foram previamente identificados com expressão diferencial em experimentos anteriores e não apresentavam similaridade com o banco de dados do NCBI.

As bactérias foram cultivadas em 3 ml de meio de cultura CG (Circle Grow Qbiogene) acrescidos de ampicilina 50 mg/ml, por 12 horas à 37°C com agitação. Utilizou-se para extração de DNA plasmidial o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Neste processo 10 ml de cada amostra foram centrifugados. O sobrenadante foi descartado e ressuspensionado em 250 µl de solução de ressuspensão. Posteriormente, foram adicionados 250 µl de solução de lise e os reagentes foram misturados por inversão 4 vezes. As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e adicionou-se 350 µl de solução de neutralização à mistura. O reagente foi misturado por inversão 4 vezes e o tubo centrifugado a velocidade de 10.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras oriundas da centrifugação foram então transferidas para uma coluna adaptada em um tubo de coleta e centrifugadas a 10.000 x g por 1 minuto. O material recolhido no tubo foi descartado e a coluna reinserida em novo tubo de coleta. Posteriormente foram adicionados 750 µl de solução de lavagem à coluna e novamente centrifugados por 1 minuto. Repetiu-se o processo de lavagem e então a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml, ao qual foram adicionados 100 µl de água livre de nuclease e procedeu-se então nova centrifugação a 10.000 x g por 1 minuto. A coluna foi removida e as

amostras recolhidas no tubo foram armazenadas a -20°C . O tamanho real dos clones foi determinado por amplificação via PCR com a utilização de iniciadores T7 e Sp6 específicos para o vetor de clonagem pSPORT1 (Invitrogen). As condições de PCR utilizadas foram: 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos.

4.6 Sequenciamento dos Clones

4.6.1 Reação de PCR

O seqüenciamento total dos clones foi realizado em seqüenciador automático ABI PRISM 3100 DNA Sequencer, utilizando o modo de terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo. Para cada amostra seqüenciada foram utilizados aproximadamente 500 ng de DNA (1 a 2 μl), 1 μl de “Big Dye” (DNA Sequencing Kit, ABI Prism), 3 μl de tampão de diluição (200 mM Tris HCl pH 9.0, 5 mM Cloreto de Magnésio) e água milliQ estéril, para completar o volume final de 10 μl . Baseados nas seqüências das extremidades 5' e 3' dos clones foram desenhados iniciadores que permitiram a continuação do sequenciamento total dos clones. No sequenciamento foram utilizados para cada clone quatro iniciadores na concentração de 5 pmoles/ μl . Dois dos iniciadores utilizados são complementares ao vetor pSPORT1 (T7 e SP6) e mais dois iniciadores complementares à seqüência de nucleotídeos dos ESTs (B11-F/B11-R e E12-F/E12-R). As condições de amplificação via PCR utilizadas foram: 95°C por 2 minutos, seguido por ciclos de 95°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos em um total de 35 ciclos.

4.6.2 Precipitação da reação de sequenciamento

Na fase de precipitação foram adicionadas 80 μl de isopropanol (75%) às amostras. As amostras foram agitadas e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos e, logo após, centrifugadas a $1800 \times g$ por 35 minutos. Posteriormente, as

mesmas foram invertidas em papel absorvente. Foram adicionados 200 μ l de etanol 70% e as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos. As amostras foram invertidas novamente em papel absorvente e deixadas secando 1 hora em temperatura ambiente. Após a precipitação as amostras foram ressuspensas em 10 μ l formamida Hi-Di (Applied Biosystem) e desnaturadas por 5 minutos a 95°C. A placa contendo as amostras foi colocada no seqüenciador para a corrida eletroforética. O processo durou em torno de 15 horas e a leitura das bases foi realizada pelo programa ABI 3100 Data Collection.

4.7 Reação de RT-PCR semiquantitativo

Pares de iniciadores específicos (B11-F/B11-R e E12-F/E12-R) foram determinados a partir das duas ESTs seqüenciadas que amplificam 201 e 202 pares de base respectivamente. Como controle endógeno foi utilizado um fragmento de 401 pares de base do gene da actina (β -actina) (KOSMAS *et al.* 2006), amplificado por iniciadores específicos e também RNA extraído das folhas como forma de comparação. A reação de PCR para as amostras foi preparada em tubos de 0,5 ml numa reação que continha: 1 μ l de cada iniciador (5 pmoles/ μ l), 2 μ l de cDNA, 2,5 μ l de tampão para PCR 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 500 mM KCl), 2 μ l de $MgCl_2$ (50 mM) e 0,4 μ l de *Taq* DNA Polimerase. A mistura foi completada com água milliQ para 25 μ l de volume final. Para quantificar os transcritos as seguintes condições de amplificação foram utilizadas: 95°C por 2 minutos, seguidos por 26 ciclos de 95°C por 45 segundos, TA°C por 45 segundos (TA = temperatura de anelamento, actina= 55 °C; B11= 58 °C e E12= 52°C) e 72°C por 45 segundos e uma fase final de extensão de 72°C por 5 minutos. As amostras obtidas no PCR foram avaliadas em gel de agarose 1,6% (p/v) com tampão TBE (Tris 89 mM pH 8,3, EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM) por 90 minutos a 80 volts. Os géis foram fotografados com a ajuda do sistema de fotodocumentação Kodak Edas 120 e posteriormente foram analisados com auxílio do programa Kodak 1D 3.5. As intensidades das bandas nos géis de agarose foram medidas e o nível de expressão

foi calculado pela divisão da intensidade das bandas dos genes estudados pela intensidade do gene controle (actina).

4.8 Southern blotting

Um volume de 15 µl do produto da amplificação via RT-PCR (cDNA) de cada amostra foi aplicado em gel de agarose (1,6%), contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese horizontal por 2h com voltagem de 85 V, conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM pH 8,3, EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM,). A amplificação foi visualizada em transiluminador e o gel foi analisado e documentado utilizando um sistema de fotodocumentação (KODAK Edas 120). Após a eletroforese os fragmentos foram transferidos para uma membrana de náilon carregada positivamente Hybond N+ (Amersham Biosciences) e as hibridizações foram executadas conforme o protocolo descrito na literatura (Sambrook e Russel, 2001).

Foram utilizados como sonda os produtos da amplificação do DNA plasmidial com os iniciadores específicos de cada clone. As sondas foram purificadas conforme o protocolo do kit CONCERT Rapid PCR – Purification System. As membranas foram reveladas por uma auto-radiografia em um filme de raio-x, onde foi visualizado a expressão dos genes estudados.

4.9 Bioinformática

A união dos fragmentos de seqüências de nucleotídeos, provenientes dos seqüenciamentos dos cDNAs estudados, foi realizada com o auxílio do software CAP que usa um algoritmo dinâmico para computar o máximo alinhamento por sobreposição entre dois fragmentos (HUANG, 1992). As seqüências de nucleotídeos denominadas como consenso foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados do NCBI através da ferramenta BLASTX com o propósito de busca por similaridade com seqüências de aminoácidos de outros organismos. Foram selecionadas as ESTs com similaridades mais representativas (e-values < e-30) (ALTSCHUL *et al.* 1990). A

tradução conceitual e a busca por domínios conservados das ESTs foram realizadas, respectivamente, com as ferramentas ORF-Finder (ROMBEI *et al.* 2002) e CD Search (MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2004) do NCBI.

V. RESULTADOS

5.1 Extração do RNA

Plântulas das cultivares de cana-de-açúcar (SP 83-2847 e SP 90-1638) foram cultivadas em casa de vegetação e submetidas a déficit hídrico para coleta de tecido foliar. O RNA extraído das folhas foi quantificado por espectrofotometria e a razão obtida entre as leituras dos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm ficou entre o esperado para amostras de RNA: entre 1,8 e 2,0. As Figuras 1 e 2 apresentam eletroforogramas de géis de agarose 1,5% onde foi analisada a integridade do RNAs extraídos.

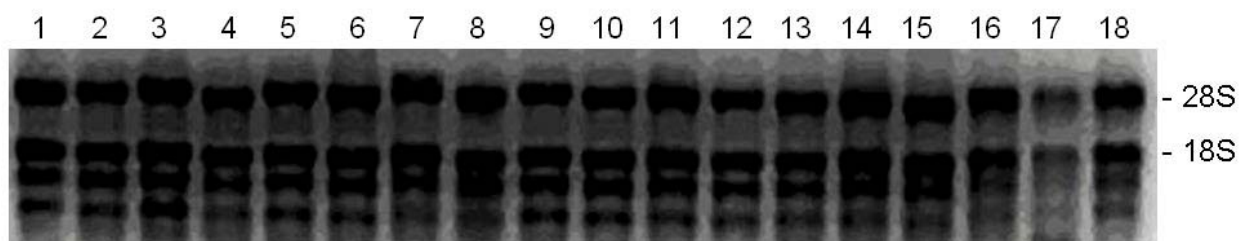


Figura 1. Eletroforograma de gel de agarose (1,5%) em condição denaturante (8,0 ml de tampão de corrida 10X, composto de MOPS 20 mM pH 7.0, acetato de sódio 50 mM e EDTA 5mM; 65 ml de água tratada com DEPC; 6,4 ml de formaldeído). As 18 amostras do cultivar SP90-1638 utilizadas no experimento foram analisadas quanto a sua integridade. As bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S estão indicadas na figura.

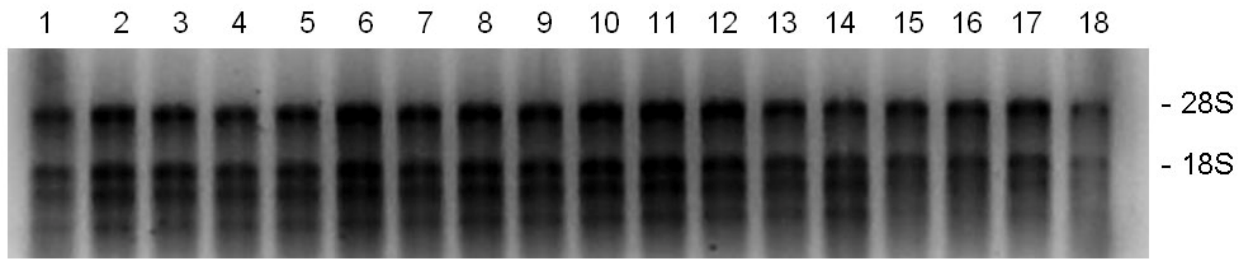


Figura 2. Eletroforograma de gel de agarose (1,5%) em condição denaturante (8,0 ml de tampão de corrida 10X, composto de MOPS 20 mM pH 7.0, acetato de sódio 50 mM e EDTA 5mM; 65 ml de água tratada com DEPC; 6,4 ml de formaldeído). As 18 amostras do cultivar SP83-2847 utilizadas no experimento foram analisadas quanto a sua integridade. As bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S estão indicadas na figura.

As amostras de RNA total extraídas foram avaliadas por meio da metodologia do RT-PCR semiquantitativo. As Figuras de 3 a 8 representam as imagens digitalizadas das amostras resultantes do teste de RT-PCR com iniciadores específicos para os clones, SCJFLR2036B11 e SCBFLR1005E12 e para o gene da actina usado como controle endógeno na variedade sensível (SP90-1638) e variedade tolerante (SP 30-2847) de cana-de-açúcar.

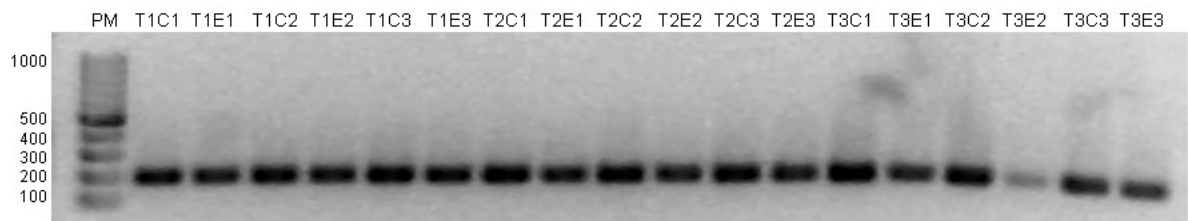


Figura 3. Eletroforograma de gel de agarose 1,6 % (tampão TBE 1x) com o resultado da amplificação por RT-PCR do clone SCJFLR2036B11 em amostras foliares da variedade sensível de cana-de-açúcar nos três tempos estudados com três repetições. T = tempo; C = planta controle e E = planta sobre estresse hídrico.

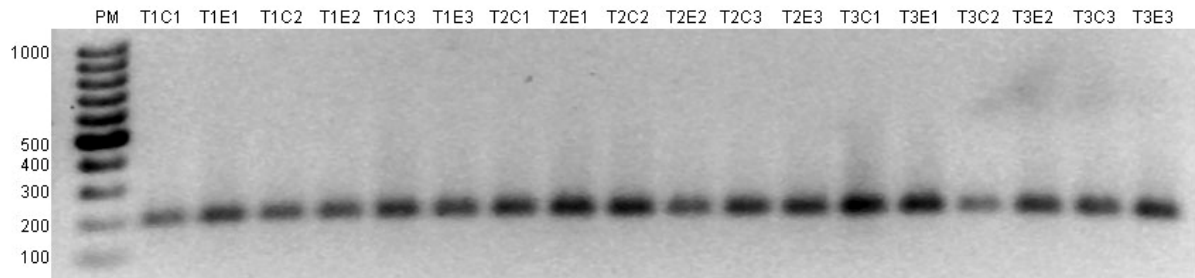


Figura 4. Eletroforograma de gel de agarose 1,6 % (tampão TBE 1x) com o resultado da amplificação por RT-PCR do clone SCJFLR2036B11 em amostras foliares da variedade tolerante de cana-de-açúcar nos três tempos estudados com três repetições. T = tempo; C = planta controle e E = planta sobre estresse hídrico.

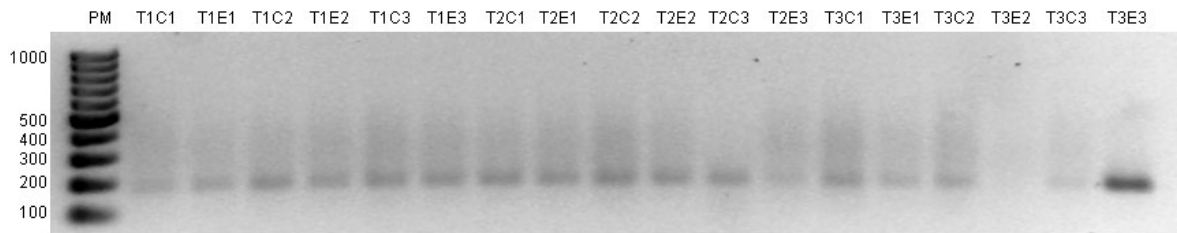


Figura 5. Eletroforograma de gel de agarose 1,6 % (tampão TBE 1x) com o resultado da amplificação por RT-PCR do clone SCBFLR1005E12 em amostras foliares da variedade sensível de cana-de-açúcar nos três tempos estudados com três repetições. T = tempo; C = planta controle e E = planta sobre estresse hídrico.

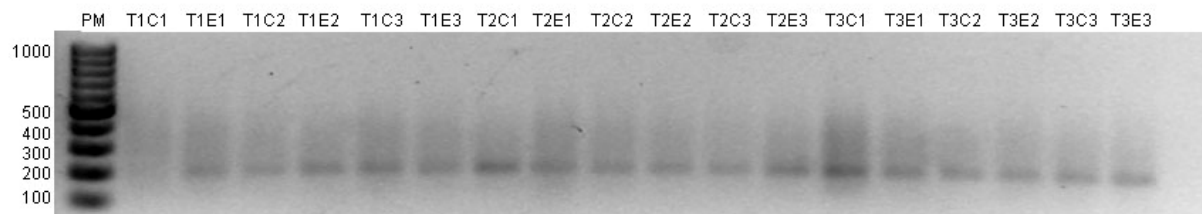


Figura 6. Eletroforograma de gel de agarose 1,6 % (tampão TBE 1x) com o resultado da amplificação por RT-PCR do clone SCBFLR1005E12 em amostras foliares

da variedade tolerante de cana-de-açúcar nos três tempos estudados com três repetições. T = tempo; C = planta controle e E = planta sobre estresse hídrico.

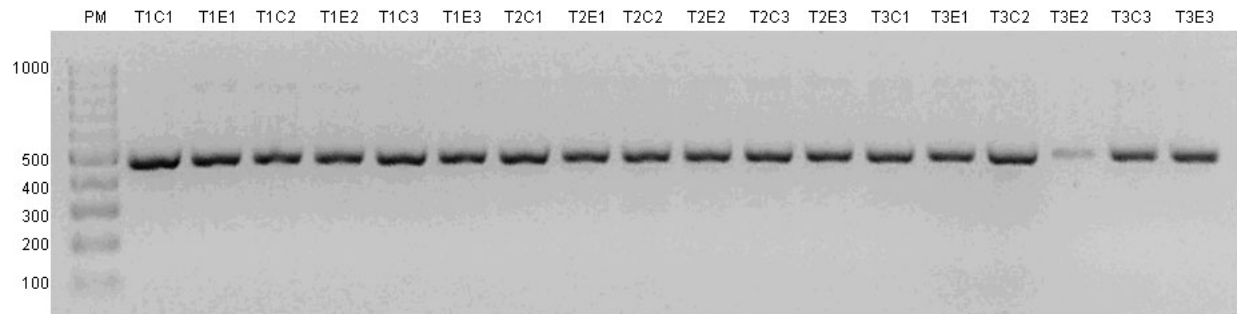


Figura 7. Eletroforograma de gel de agarose 1,6 % (tampão TBE 1x) com o resultado da amplificação por RT-PCR do gene actina (controle endógeno) em amostras foliares da variedade sensível de cana-de-açúcar nos três tempos estudados com três repetições. T = tempo; C = planta controle e E = planta sobre estresse hídrico.

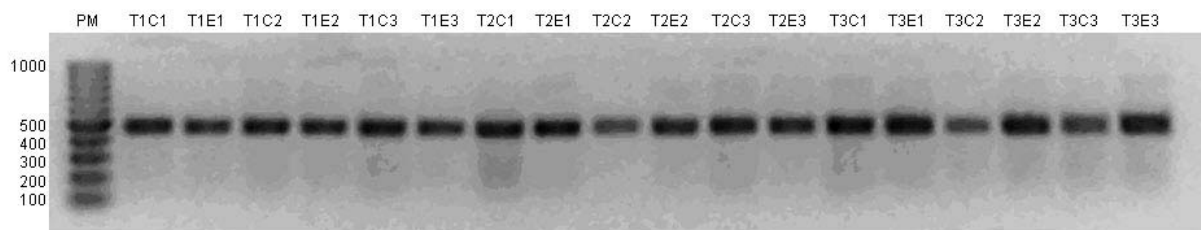


Figura 8. Eletroforograma de gel de agarose 1,6 % (tampão TBE 1x) com o resultado da amplificação por RT-PCR do gene actina (controle endógeno) em amostras foliares da variedade tolerante de cana-de-açúcar nos três tempos estudados com três repetições. T = tempo; C = planta controle e E = planta sobre estresse hídrico.

5.2 Identificação das seqüências de aminoácidos das ESTs

A identificação das seqüências foi realizada por seqüenciamento dos clones utilizando iniciadores específicos (Tabela 1). Os iniciadores foram desenhados baseados na seqüência previamente determinada dos ESTs SCJFLR2036B11 (B11-F/B11-R) e SCBFLR1005E12 (E12-F/E12-R) de *Saccharum* spp provenientes do projeto SUCEST que continham, inicialmente, 524 e 1118 pb respectivamente.

Tabela 1. Iniciadores usados no seqüenciamento (*) e RT-PCR dos clones SCJFLR2036B11 e SCBFLR1005E12.

Nome	Seqüência (5' → 3')	Genes	Orientação	Posição
Sp6	TATTTAGGTGACACTATAG	VETOR	5' → 3'	vetor
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	VETOR	5' → 3'	vetor
B11seq-A*	GGGACACAGGCAGAAGTT	SCJFLR2036B11	5' → 3'	252-269
B11-F	AAGATGAGCCGTGGTGGTAGC	SCJFLR2036B11	5' → 3'	167-188
B11-R	AGCCCTGTGGTAGTTGTTGG	SCJFLR2036B11	3' → 5'	348-368
E12-F	TTGGTGCTATCTTCCCTG	SCBFLR1005E12	5' → 3'	259-277
E12-R	CTGTGTCCCTGCTGTTAG	SCBFLR1005E12	3' → 5'	443-461
actina-F	ACAATGGCACAGGAATGG	<i>Actina</i>	5' → 3'	38-55
actina-R	AGCATAGAGGGAGAGCAC	<i>Actina</i>	3' → 5'	421-438

O seqüenciamento completo dos clones de cDNA SCJFLR2036B11 e SCBFLR1005E12 determinou a existência de 1060 e 971 pb, respectivamente, o que culminou com aumento no número de bases determinada anteriormente para o clone SCJFLR2036B11 (VETTORE *et al.* 2001). As seqüências obtidas foram alinhadas e com ajuda do software CAP geraram seqüências consenso para os dois clones, uma com 1060 pb (SCJFLR2036B11) e outra com 971 pb (SCBFLR1005E12). Utilizando a ferramenta BlastX foi possível a análise de similaridade de seqüência entre os cDNAs estudados e o banco de dados e verificou-se uma similaridade significativa entre as seqüências de SCJFLR2036B11 e os genes da nitrilase (EC 3.5.5.1) e SCBFLR1005E12 com um tipo de elemento genético móvel (Retrotransposon) (Tabela 2). Para o clone SCJFLR2036B11 foram encontrados valores de e-value significativos

com uma provável proteína associada a nitrilase de *Arabidopsis thaliana*, *Rheum australe*, *Sandersonia aurantiaca* com valores de 2,00 e-13, 2,00 e-11 e 8,00 e-10, respectivamente. Para o fragmento de seqüência do clone SCBFLR1005E12 foram encontrados valores significativos de e-value com uma provável transcriptase reversa identificada em Sorgo, além de um provável retrotransposon encontrado em arroz, e uma proteína hipotética também de arroz, com 1,00 e-28, 6,00 e-33 e 2,00 e-21, respectivamente (Tabelas 2 e 3).

Além da similaridade, a porcentagem de identidade entre as seqüências apresentou valores consideravelmente altos que aliados a baixos valores de e-value permitem a confiabilidade nos resultados do BlastX para as seqüências estudadas (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 Similaridade do clone SCJFLR2036B11 de cana-de-açúcar com de genes de outros organismos obtidas pelo BlastX.

Proteína	Organismo	GenBank No.	Identidade (%)	Similaridade (%)	E-value
Putative nitrilase	<i>A. thaliana</i>	AAD20083.1	70	85	2,00e-13
Putative nitrilase	<i>R. australe</i>	ABX10748.1	72	85	2,00e-11
Putative nitrilase	<i>S. aurantiaca</i>	AAU05601.1	68	79	8,00e-10

Tabela 3. Similaridade do clone SCBFLR1005E12 de cana-de-açúcar com de genes de outros organismos obtidas pelo BlastX

Proteína	Organismo	GenBank No.	Identidade (%)	Similaridade (%)	E-value
Retrotransposon protein	<i>O. sativa</i>	ABA97790.1	48	65	1,00e-28
Putative reverse transcriptase	<i>S. bicolor</i>	AAM94327.1	43	63	6,00e-33
Hypothetical protein	<i>O. sativa</i>	AAV25285.1	42	66	2,00e-21

Com a ajuda da ferramenta ORF Finder foi possível deduzir a seqüência de aminoácidos de SCJFLR2036B11 e SCBFLR1005E12 que apresentam respectivamente 132 e 188 aminoácidos (Figura 9 e 10).

```

166 atgagccgtggtggttagcgccggtggtggtcaaagttctctgggc
    M S R G G S A G G G Q S S L G
211 tacctctttggaagcggtgagcccccaaccagcggtggcacca
    Y L F G S G E P P K P A V A P
256 ccagctgcaactgctccacctgctgagaaaccacctgccgtaaag
    P A A T A P P A E K P P A V K
301 cctgatatgaacaagcagattgctgctggggttaccagccaaacc
    P D M N K Q I A A G V T S Q T
346 aacaactaccacagggctgatggacaaaacaccgggaacttcctt
    N N Y H R A D G Q N T G N F L
391 acggatcgtccttcgaccgaggtccacgctgctcctggcgggtggc
    T D R P S T E V H A A P G G G
436 tcttcctgaggctacgtgtgtgggggcccactgatgctgatggtt
    S S L R L R V W G P L M L M V
481 cgctgctgcatcagagtgagcccaccgcggttcgagccggccgc
    R C C I R V S P P R L R A G R
526 ctgctgtaatgccccgagaacgcgggcggtcagcgagtga 564
    L R E C P R T R A V S E *

```

Figura 9. Provável seqüência de aminoácidos gerados pela tradução da seqüência do clone SCJFLR2036B11.

```

359 atggataatatcatcaatgctaacagcagggacacaggcagaagt
    M D N I I N A N S R D T G R S
404 tggaaatattttgaattggaatattagaggggttgaattttgaagat
    W N I L N W N I R G L N F E D
449 aaatgtaatgcaatcaaagaaaaaatagaggggaagtgcatgctcc
    K C N A I K E K I E G S A C S
494 attttttgcattccaggaaccaaacgtgaccactttgaccattca
    I F C I Q E T K R D H F D H S
539 tatataaaaaaattagctcccaagcgtttcaacagatttgcttac
    Y I K K L A P K R F N R F A Y
584 tttccttcagaaggggcatgttgagggaatattgattggctggaat
    F P S E G A F G G I L I G W N
629 agctcagtatttactgggtgaagtgggtcaaataaataaattttct
    S S V F T G E V G Q I N K F S
674 gtcacggtcaagttcacctcaaccataatggacaaatttgacc
    V T V K F T S T H N G Q I W T
719 ctcacctctgtttatggtccttgtaatggtcctgctagagaagat
    L T S V Y G P C N G P A R E D

```

```

764 tttgtagaatgggtcaacaattttcaaattgatgctgctgataac
    F V E W V N N F Q I D A A D N
809 ttgatgttggcaggagacttttaaaaaaaaaaaaaaaaaacccaaacc
    L M L A G D F K K K K K T Q T
854 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaactaacaaaaaagaaaaaaaaaaaaa
    K K K K K K K L T K K K K K K
899 aaaagggcgccgctctagaaatctaa 925
    K R A A A L E I *

```

Figura 10. Provável seqüência de aminoácidos gerados pela tradução da seqüência do clone SCBFLR1005E12.

5.3 Expressão dos genes

Os resultados de RT-PCR semiquantitativo, bem como do Southern estão apresentados nas Figuras 11 (A) e (B) e 12 (A) e (B), para os clones SCJFLR2036B11 e SCBFLR1005E12 respectivamente. Os resultados confirmaram a expressão diferencial apresentada pelos genes nos experimentos de macroarranjo. O mesmo sendo detectado nos experimentos de Southern blot. Na Figura 11A estão os resultados obtidos para amostras de folhas do cultivar sensível na situação controle e estressada por déficit hídrico, nela verifica-se que houve uma indução da expressão do gene na situação de deficiência hídrica (E1, E2 e E3). Muito embora seja possível verificar um aumento no nível de expressão do gene também pelo RT-PCR, esse aumento fica muito mais evidente no experimento de Southern blot. Na Figura 11B são apresentados os resultados obtidos para o cultivar tolerante, onde verifica-se a repressão os níveis de expressão do gene nos experimentos de RT-PCR e Southern blot, na situação de estresse hídrico. Para esse cultivar o gene mostrou-se menos expresso na situação de estresse (E1, E2 e E3), embora os níveis de expressão para as plantas controle também tenham sido observados. Na figura 12A são apresentados os resultados dos valores de expressão dos genes representado pelo cDNA SCBFLR1005E12 para o cultivar sensível, os experimentos de RT-PCR mostram que não houve variação nos valores de expressão do gene nos diferentes tempos analisados, muito embora no tempo T3, uma ligeira repressão do gene na planta submetida ao estresse hídrico pode

ser verificada, o que evidentemente não foi encontrado nos experimentos de Southern. Pode-se inferir que, considerando-se que a amplificação da segunda fita, gene específica, para os dois genes, utilizou-se a mesma primeira fita de cDNA, a expressão do gene representado pelo cDNA SCBFLR1005E12 é muito maior que a do cDNA SCJFLR2036B11. Já a figura 12B apresenta os resultados obtidos para o cultivar tolerante onde verifica-se um aumento dos níveis de expressão gênica nas plantas controle, em relação à estressada, mesmo considerando os altos valores obtidos para os desvios padrão nos experimentos de RT-PCR. A indução da expressão do gene nas plantas submetidas ao déficit hídrico é menos evidente e menor que a obtida para as plantas controle. Pelo resultado do Southern blot é possível confirmar o ligeiro aumento nos níveis de expressão do gene nas plantas controle quando comparadas com sob estresse hídrico mesmo havendo uma leve repressão gênica no tempo T3.

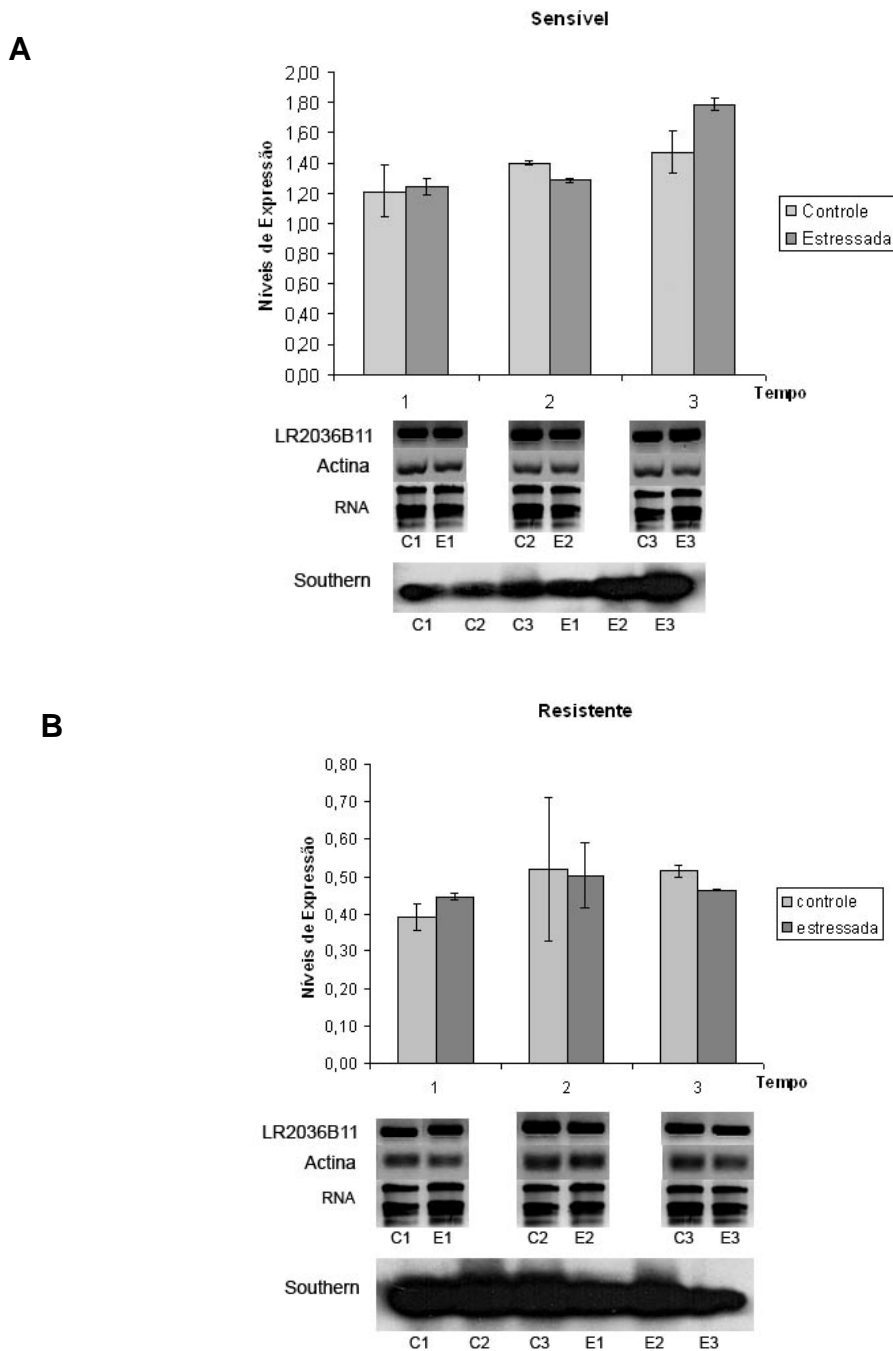


Figura 11. Análise da expressão relativa do clone SCJFLR2036B11, em plantas controle (barras cinza claro) e estressada (barras cinza escuro), nas cultivares sensível (A) e tolerante (B) (três repetições cada tratamento). T1=24h; T2=72h; T3=120h, onde C (1, 2 e 3) representam as plantas controle nos três tempos e E (1, 2 e 3) as plantas estressadas nos três tempos. O gene da actina foi utilizado como controle endógeno para as amostras de RT-PCR e o RNA foi utilizado como controle para assegurar iguais quantidades e a integridade nas análises de Southern blot.

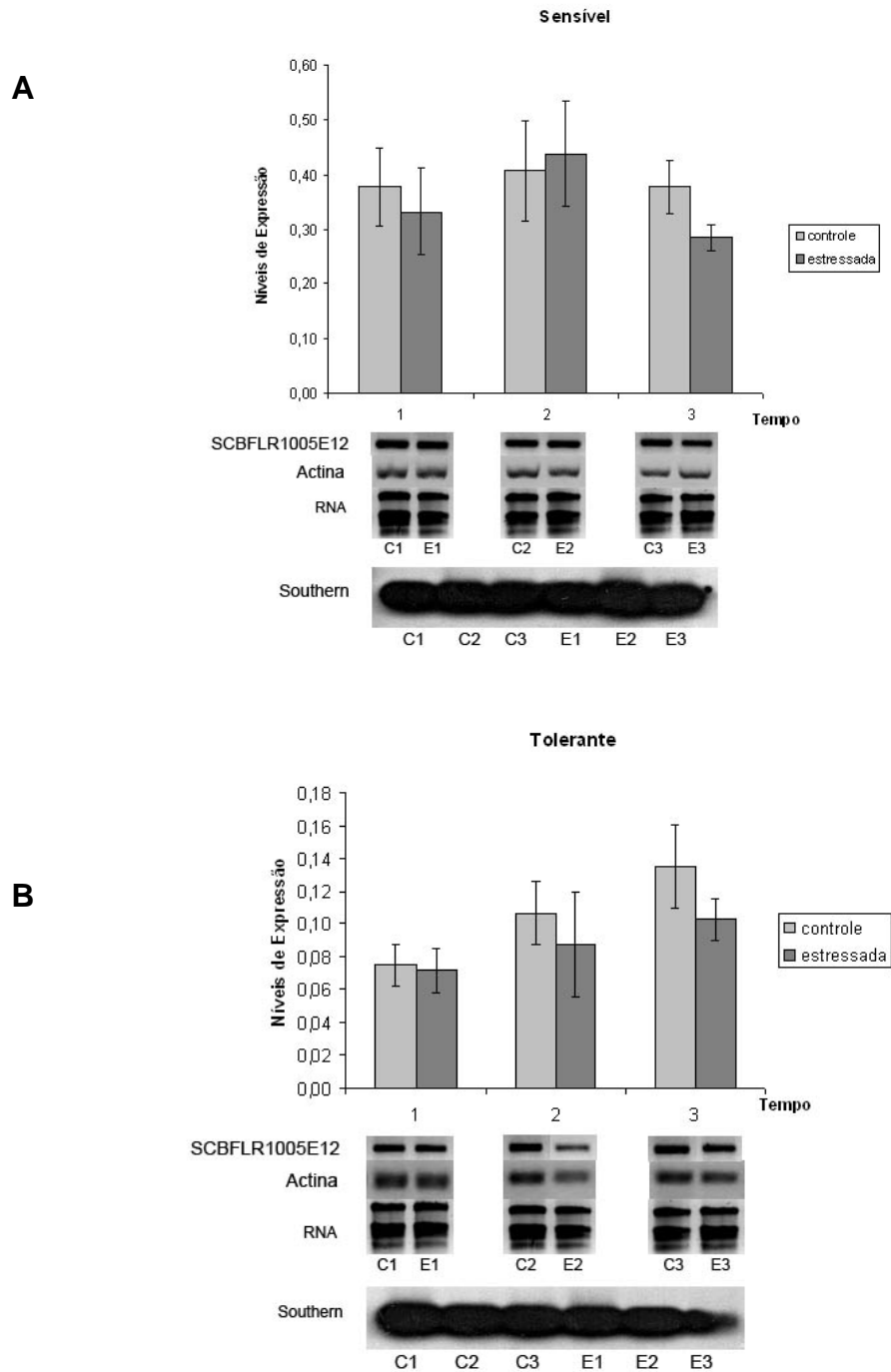


Figura 12. Análise da expressão relativa do clone SCBF1R1005E12, em plantas controle (barras cinza claro) e estressada (barras cinza escuro), nas cultivares sensível (A) e tolerante (B) (três repetições cada tratamento). T1=24h; T2=72h; T3=120h, onde C (1, 2 e 3) representam as plantas controle nos três tempos e E (1, 2 e 3) as plantas estressadas nos três tempos. O gene da actina foi utilizado como controle endógeno para as amostras de RT-PCR e o RNA foi utilizado como controle para assegurar iguais quantidades e a integridade nas análises de Southern blot.

VI. DISCUSSÃO

As plantas respondem ao estresse de várias maneiras e através da ativação de genes que conferem características que supostamente fazem da planta tolerante ou sensível ao estresse. Existem genes transdutores de sinal que levam as informações ativando vias de resposta da planta aos fatores ambientais de estresse. Vários destes genes foram identificados nas diferentes culturas (CASAGRANDE *et al.* 2001; RABANNI *et al.* 2003 e RIZHSKYi *et al.* 2004) e especialmente em cana-de-açúcar nos últimos tempos, associados às diferentes respostas das plantas (PAPINI-TERZI *et al.*, 2005; DABBAS *et al.* e 2006; FERRO *et al.* 2007). O aumento pronunciado dos níveis de expressão gênica para o gene similar a nitrilase verificado nos experimentos na planta sensível indicou uma possível resposta da planta aos níveis de déficit hídrico como já relatado na literatura (CORUZZI & LAST, 2000), onde observou-se a indução da biossíntese de aminoácidos aromáticos, tais como triptofano, fenilalanina e tirosina. O mesmo foi verificado por BRAY (2002) analisando plantas de *A. thaliana* submetidas a estresse hídrico. A nitrilase faz parte da biossíntese do triptofano, através da rota IAN (indol-3-acetonitrila), que converte IAN em AIA por meio da ação da nitrilase. O hormônio vegetal, auxina (ácido-indol-3-acético-AIA), é estruturalmente relacionado ao aminoácido triptofano, sendo este, portanto, um aminoácido precursor para sua biossíntese. Muitas evidências têm demonstrado que os vegetais convertem triptofano em AIA através de várias rotas metabólicas. O IAN é um candidato a precursor da via independente do triptofano para a biossíntese de auxina. A rota IAN parece ser importante em apenas três famílias botânicas, sendo uma delas, a Poaceae (família das gramíneas). A nitrilase também parece atuar na via de síntese independente do triptofano, visto que IAN pode ser produzido nesta rota a partir do indol-3-glicerol fosfato. Embora o AIA seja um importante hormônio de crescimento, ele também é responsável pela indução de genes de resposta ao estresse, tal como uma lesão. Vários genes, que codificam as enzimas glutathione-S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18), uma classe de proteínas antioxidantes ativadas por várias condições de estresse, são induzidos por concentrações elevadas de auxina (ácido indol-3-acético). Da mesma

forma, a ACC sintase (1 aminociclopropano-1-ácido carboxílico), também induzida pelo estresse e etapa limitante na biossíntese de etileno, é induzida por altos níveis de AIA (CROZIER *et al.*, 2000; TAIZ e ZEIGER, 2004).

As auxinas são hormônios vegetais, que tem como natureza química o ácido indol-3-acético, sendo este a principal auxina de ocorrência natural. Os locais de biossíntese ocorrem primeiramente nos primórdios foliares e folhas jovens e nas sementes em desenvolvimento, sendo o AIA transportado de célula a célula e unidirecional. Os efeitos da auxina nas plantas é a dominância apical, respostas trópicas, diferenciação dos tecidos vasculares, promoção da atividade cambial, indução de raízes adventícias em estação, inibição da abscisão de folhas e frutos, estimulação da síntese de etileno, e estimulação do desenvolvimento do fruto. (RAVEN, *et al* 2001). A auxina, como descrito anteriormente, estimula a síntese de outro hormônio vegetal, o etileno (C₂H₄), que é sintetizado a partir de metionina, e é o único hidrocarboneto com efeito pronunciado nas plantas. Os locais de biossíntese são na maioria dos tecidos em respostas ao estresse, especialmente em tecidos senescentes ou em amadurecimento. Os principais efeitos do etileno é o amadurecimento de frutos, senescência das folhas e flores, e abscisão de folhas e frutos (RAVEN, *et al.* 2001). A abscisão é a queda das folhas, flores e frutos, ou de outras partes da planta, geralmente após a formação de uma zona de abscisão, que é a área base de uma folha, flor, fruto, ou de outras porções da planta contendo tecidos envolvidos na separação de uma destas partes do corpo da planta.

Desta forma, pode-se traçar um paralelo entre o hormônio etileno e o trabalho aqui realizado sobre estresse hídrico em cana-de-açúcar. Neste trabalho foi identificado entre os genes analisados, a nitrilase, uma enzima envolvida na biossíntese da auxina (ABELES *et al.* 2001), e esta por sua vez, está envolvida na estimulação de síntese de etileno. O etileno nas plantas influencia em diversos aspectos de crescimento e desenvolvimento, e é associado igualmente com a resposta da planta à estresses, como a seca, ferimentos, infecções e transdução de sinal (XU *et al.* 1998). Pode-se verificar uma maior produção do hormônio etileno quando a planta foi submetida a falta de água, isto é, sob condição de déficit hídrico. Inicialmente as folhas se fecham de

modo a absorver uma menor quantidade de luz, e com isso diminui diretamente a quantidade de energia absorvida, provocando, conseqüentemente, uma diminuição da quantidade de água consumida por esta para as sínteses necessárias a sobrevivência. Com o agravamento da falta de água, a planta promove então a abscisão, provocando a queda das folhas.

A resposta da planta tolerante parece ser mais rápida e a ativação do gene da nitrilase ocorre mesmo nas plantas onde foi mantida a irrigação normal, ou seja, plantas controle, em contrapartida as plantas do cultivar sensível parece que acionam seu sistema de resposta apenas tardiamente fato este evidenciado pelo aumento da expressão do gene no tempo T3, após 120 h de supressão de rega.

O clone SCBFLR1005E12 com similaridade ao elemento móvel, Retrotransposon, encontra-se incompleto e a porção seqüenciada de aproximadamente 1000 pb representa apenas parte do gene. Retrotransposons são elementos genéticos móveis presentes em grande número de cópias em organismos eucariotos, especialmente em plantas onde respondem por até 50% do conteúdo de DNA. Eles são normalmente inativos, muito embora alguns mantenham sua habilidade em plantas quando estas estão submetidas à condição de estresse. A região promotora destes genes apresenta elementos regulatórios *cis* que são associados a via de transdução de sinal relacionadas a resposta de defesa da planta. Na região 5' do retrotransposon Bare1 que contém elementos ABRE que respondem ao ABA (SUONIEMI *et al.* 1996). TAPIA *et al.* 2005, descreveram o envolvimento de retrotransposons de *Lycopersicon chilense* na resposta a estresse induzido por etileno. Nesta seqüência foram identificados PERE Box, o primeiro elemento responsivo ao etileno e que estão presentes nas duas seqüências repetitivas do gene cuja seqüência completa de nucleotídeos apresenta 5248 pb. Esse retroelemento em *L. chilense* apresenta uma ORF simples de 1328 aa, composta por dois domínios *gag* e *pol* (prot endo e RT). Nossa seqüência apresentou 65% de similaridade com uma ORF de RT (transcriptase reversa) descrita em *Sorgum bicolor* por SONG *et al.* (2002) e 48% com arroz (Tabela 3).

VII. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- Os resultados apresentados por RT-PCR semi-quantitativo bem como o de Southern blot confirmaram a expressão diferencial apresentada pelos genes nos experimentos de macroarranjo.
- Para o clone SCJFLR2036B11 observou-se uma indução da expressão do gene na situação de déficit hídrico no cultivar sensível para os três tempos estudados, muito embora no cultivar tolerante a indução do gene ocorreu na situação controle (onde não houve a supressão da irrigação das plantas).
- A situação de déficit hídrico em cana-de-açúcar induz o aumento da expressão do gene da Nitrilase.
- Para o clone SCBFLR1005E12 verificou-se que no cultivar sensível não houve variações nos níveis de expressão tanto na situação controle como na situação de déficit hídrico. No cultivar tolerante a indução do gene nas plantas submetidas ao déficit hídrico é menos evidente e menor que nas plantas controle.
- A similaridade encontrada do clone SCBFLR1005E12 com elementos genéticos móveis está relacionada a resposta das plantas quando estas estão submetidas a condições de déficit hídrico.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCOPAR - Associação de Produtores de Bioenergia do Estado do Paraná. 2005. Disponível em: <<http://www.alcopar.org.br>>. Acesso em: 10 out. 2008.

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.

BARSALOBRES, C. F. **Análise da expressão gênica induzida por *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar via macroarranjo de colônias bacterianas**. 2004. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas). Departamento de Agronomia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BRASIL, Cooperativa de Produtores de Cana, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo. 7ª Geração de variedades de cana-de-açúcar Copersucar. São Paulo, 1999. 32p. (**Boletim Técnico**).

BRASIL, Cooperativa de Produtores de Cana, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo. 9ª Geração de variedades de cana-de-açúcar Copersucar. São Paulo, 2003. 16p. (**Boletim Técnico**).

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Balanco nacional de cana-de-açúcar e agroenergia**. Brasília, 2007. 139 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU_LATERAL/AGRICULTURA_PECUARIA/CANA_DE_ACUCAR_AGROENERGIA/SR_ESTATISTICAS/PDF%20-%20BALAN%C7O%20NACIONAL_0.PDF>. Acesso em: 24 set. 2008.

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

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: **American Society of Plant Physiologists**, p. 1158-1203, 2000.

BULL, T. **The sugarcane plant**. In "Manual of cane growing", HOGARTH, M, ALLSOPP, P., eds. Bureau of Sugar Experimental Stations, Indooroopilly, Australia. p.71-83, 2000

CARDING, S. R.; LU, D.; BOTTOMLY, K. A. A polymerase chain reaction assay for the detection and quantification of cytokine gene expression in small number of cells, **Journal of Immunological Methods**, v. 151, p. 277-287, 1992.

CARSON, D. L.; BOTHA, F. C. Preliminary analysis of sequence tags for sugarcane. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 1769-1779, 2000.

CARSON, D. L.; BOTHA, F. C. Genes expressed in sugarcane maturing internodal tissue. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1075-1081, 2002.

CESNIK, R. Melhoria da cana-de-açúcar. **Embrapa: Informações Tecnológicas**. Brasília, 2004. 307p.

DABBAS, K. M.; FERRO, M. I. T.; BARROS, N. M.; LAIA, M. L.; ZINGARETTI, S. M.; GIACHETTO, P. F.; MORAES, V. A.; FERRO, J. A. Genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar inoculada com *Xanthomonas albilineans*, o agente causal da escaudadura da folha. **Summa Phytopathologica, Botucatu**, v. 32, p. 328-338, 2006.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J. C. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars

(*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 250, p. 405-413, 1996.

DOOREMBOS, J.; KASSAN, A. H. **Efectos del agua sobre el rendimiento de los cultivos**. Roma. FAO, 1979. 212p. (FAO. Riego y Drenaje, 33).

DOS SANTOS, E. G. D.; GERALDI, I. O. **O melhoramento genético da cana-de-açúcar da RIDESA**. Programa de pós-graduação em genética e melhoramento de plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007. Disponível em: <<http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/EGDSantos-200701-Resumo.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2008.

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v. 252, p. 1643-1651, 1991.

FERRO, M. I. T.; BARROS, N. M.; DABBAS, K. M.; LAIA, M. L.; KUPPER, K. C.; MORAES, V. A.; OLIVEIRA, J. C. F.; FERRO, J. A.; ZINGARETTI, S. M. Análise do perfil de expressão dos genes da cana-de-açúcar envolvidos na interação com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Summa Phytopathologica, Botucatu**, v. 33, p. 157-166, 2007.

FREEMAN, W.M.; WALKER, S.J.; VRANA, K.E.; Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, v. 26, p. 112-122, 1999.

HOEVEN, R.V.; RONNING, C.; GIOVANNONI, J. *et al.* Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based of analysis of a large of expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. **The Plant Cell**, v.14, p.1441-1456, 2002.

HOGART, D. Genetics of sugarcane. IN: HEINZ, D. J. (Ed.). Sugarcane improvement through breeding. Amsterdam: **Elsevier Press**, 1987. p. 255-271.

HSIAO, T. C. Plant responses to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, v.24, p. 519-570, 1973.

HUANG, X. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. **Genomics**, v. 14, p. 18–25, 1992.

IEA - Instituto de Economia Agrícola da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. 2000. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>>. Acesso em: 14 ago. 2008.

INGELBRECHT, I. L.; IRVINE, J. E.; Mirkov, T. E., Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploidy genome 1. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1187-1197, 1999.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to waters deficits. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, p. 185-202, 2005.

JUNQUEIRA, E. D. A cana-de-açúcar: origem e influência. **JORNAL DA CANA**. 2006. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/Conteudo/HistoriadoSetor.asp>>. Acesso em: 18 jul. 2008.

KARIM, S. **Exploring plant tolerance to biotic and abiotic stresses**. Tese (Doutorado) - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suécia, p.66, 2007.

KOSMAS, S. A., ARGYROKASTRITIS, A., LOUKAS, M. G., Eliopoulos E, Tsakas, S., Kaltsikes P.J. (2006) Isolation and characterization of drought-related trehalose 6-phosphate-synthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Planta** 223: 329–339.

LARCHER, W. A planta sob estresse. In: LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: RiMa, 2004. p. 341-478. KRAMER, P.J. & BOYER, J.S. **Water relations of plant and soils**. San Diego, Academic Press, 1995. 495p.

LOCY, R. D.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Stress Physiology. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002. p. 2438-2442.

MA, H. M.; SCHULZE, S.; LEE, S. *et al.* An EST Surrey of a sugarcane transcriptome. **Theoretical and Applied Genetics**, publicação on line. Acesso em: 25 set. 2008.

MAGUIRE, T. L.; GRIMMOND, S.; FORREST, A. *et al.* Tissue-specific gene expression in soybean (*Glycine max*) detected by cDNA microarray analysis. **Journal of Plant Physiology**. v. 159, p.1361-1374, 2002.

MARCHELER-BAUER, A.; BRYANT, S. H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res*, v.32, p. 327–331, 2004.

MARONE, M.; MOZZETTI, S.; DERITIS, D.; PIERELLI, L.; SCAMBIA, G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. **Biol. Proced. Online**, v. 3, p. 19– 25, 2001.

MATSUOKA, S. *Botânica e Ecofisiologia da cana-de-açúcar*. Maringá: **UFPR/SENAR**, 1996, 26p.

MATSOUKA, S.; GARCIA, A.A.F.; ARIZONO, H. Melhoria de cana-de-açúcar. **IN: BORÉM, A. (Ed.)**. Melhoria de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, 1999. p.205-251.

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 23, p. 12-18, 2001.

OMETO, J.C. Parâmetros meteorológicos e a cultura da cana-de-açúcar. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1980. p. 17.

PAPINI-TERZI, F. S.; ROCHA, F. R.; VÊNCIO, R. Z. N.; OLIVEIRAI, K. C.; FELIX, J. M.; VICENTINI, R.; ROCHA, C. S.; SIMÕES, M. A. C. Q.; ULIANI, E. C.; ZINGARETTI, S. M.; SILVA, A. M.; PEREIRA, C. A. B.; MENOSSI, M.; SOUZAa, G. M. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. **DNA Research**, v. 12, p. 27-38. 2005.

RABBANI, M. A.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; AYUB KHAN, M.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1755-1767. 2003.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6th edition. Brasil. Ed. Guanabara Koogan. 2001. p. 650-658.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DALVLETOVA, S.; MITTLER, R. (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1683-1696.

RODRIGUES, F. A. **Expressão gênica diferencial em folhas de cana-de-açúcar sob estresse hídrico**. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004. 67 f.

ROMBEL, I.T.; SYKES, K.F.; RAYNER, S.; JOHNSTON, A.S. Orf-Finder: a vector for high-throughput gene identification. **Gene**, v. 282, p. 33-41. 2002.

SACILOTO, R. F. Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. Dissertação (Mestrado – Departamento de Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, - Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 74, 2003.

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

SAMBROOK J., RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3rd ed. Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y, 2001.

SCHUMMER, M.; N.G., W.V.; BUMGARNER, R.E. *et al.* Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNA for discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. **Gene**, v.238, p.375-385, 1999.

SHARP, R. E.; POROYKO, V.; HEJLEK, L. G.; SPOLLEN, W. G.; SPRINGER, G. K.; BOHNERT, H. J.; NGUYEN, H. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. In: **INTERNATIONAL CROP SCIENCE CONGRESS, 2004**, Austrália, p. 1-11. Disponível em: <www.cropscience.org.au>. Acesso em: 18 out. 2008.

SONG, R.; LLACA, V.; MESSING, J. M. Organization of Orthologous Sequences in Grass Genome. **Genome Research**. 12:1549-1555. 2002.

SOUZA, G. M.; SIMÕES, A. C. Q.; OLIVEIRA, K. C.; GARAY, H. M.; FIORINI, L. C.; GOMES, F. S.; NISHIYAMA JUNIOR, M. Y.; DA SILVA, A. M. The sugarcane signal transduction (SUCAST) catalogue; prospecting signal transduction in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.25-34, 2001.

SOUZA, G. M. & DA SILVA, A. M. SUCAST: Desvendando as vias de transdução de sinal da cana-de-açúcar. **Biociência**, v.25, p. 58-63, 2002.

SUCEST. Disponível em <http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/cgi-bin/prod/blast/form_maker.pl>. Acesso em: 10 ago. 2008.

SUONIEME, A.; ANAMTHAWAT-JONSON, K.; ARNA T.; SCHULMAN, A. H. Retrotransposon BARE-1 is major, dispersed component of the barley (*Hordeum vulgare* L) genome. **Plant Mol Biol** 30:1321-1329. 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3a ed., Porto Alegre: ARTMED Editora S.A., 2004.

TAPIA, G.; VERDURGO, I.; YAÑEZ, M.; AHUMADA, I.; THEODULOZ, C.; CORDERO, C.; POBLETE, F.; GONZÁLEZ, E.; RUIZ-LARA, S., Involvement of ethylene in stress-induced expression of the TLC1.1 retrotransposon from *Lycopersicon chivense* Dun. **Plant Physiology**, v.138, p. 2075-2086, 2005.

TELLES, G. P.; BRAGA, M. D. V.; DIAS, Z.; LIN, T. L.; QUITZAU, J. A. A.; DA SILVA, F. R.; MEIDANIS, J. Bioinformatics of the Sugarcane EST Project. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, n. 1-4, p. 9-15, 2001.

THIAGO, L. R. L. S.; VIEIRA, J. M.; Cana-de-açúcar: uma alternativa de alimento para a seca. Campo Grande: **Embrapa - Gado de corte**, 2002. (Comunicado Técnico, 73).

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **A história da cana-de-açúcar no mundo**. São Paulo, 2008a. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/memorias/cana/historia>>. Acesso em: 24 set. 2008.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Produção e uso do etanol combustível no Brasil**. São Paulo, 2008b. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 24 abr. 2008.

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

VETTORE, A. L. *et al.* Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, v. 13, p. 2725–2735, 2003.

XU, P.; NARASIMHAN, M. L.; SAMSON, T.; COCA, M. A.; HUH, G.; ZHOU, J.; MARTIN, G. B.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; A nitrilase-like protein interacts with GCC box DNA-binding proteins involved in ethylene and defense responses. **Plant Physiology**, v 118: 867-874, 1998.

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