

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DURANTE DÉFICIT  
HÍDRICO EM DUAS CULTIVARES DE  
CANA-DE-AÇÚCAR.**

**Gisele Cristina Dedemo**

**Orientadora: Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti Di mauro**

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

Jaboticabal – SP  
Abril - 2006

D299e Dedemo, Gisele Cristina  
Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em duas  
cultivares de cana-de-açúcar / Gisele Cristina Dedemo. --  
Jaboticabal, 2006  
xiv, 75 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006  
Orientador: Sonia Marli Zingaretti Di Mauro  
Banca examinadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro, Renê de  
Oliveira Beleboni  
Bibliografia

1. Estresse por seca. 2. *Saccharum* spp. 3. Macroarranjo de  
cDNA. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 633.61

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

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**GISELE CRISTINA DEDEMO** – nascida no município de Ribeirão Preto, São Paulo em 21 de fevereiro de 1977, filha de Ulysses Dedemo e Maria do Carmo Bertolai Dedemo. Bióloga, graduada em bacharelado e licenciatura pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), em dezembro de 2001 e 2002, respectivamente. Em março de 2004 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticabal).

*"Eu pedi FORÇAS e Deus me deu DIFICULDADES para me fazer forte;*

*Eu pedi SABEDORIA e Deus me deu PROBLEMAS para resolver;*

*Eu pedi PROSPERIDADE e Deus me deu CÉREBRO e MÚSCULOS para trabalhar;*

*Eu pedi CORAGEM e Deus me deu PERIGO para superar;*

*Eu pedi AMOR e Deus me deu PESSOAS COM PROBLEMAS para ajudar;*

*Eu pedi FAVORES e Deus me deu OPORTUNIDADES;*

*Eu não recebi NADA que PEDE, mas recebi TUDO que PRECISAVA."*

*(autor desconhecido)*

*Aos meus queridos pais, **Ulysses e Maria do Carmo***

*Que jamais mediram esforços para me oferecer condições de estudar e de vencer na vida. Obrigada pelo amor e incentivo sempre destinados ao meu fortalecimento pessoal e espiritual. Amo vocês.*

*A minha querida irmã, **Gislaine***

*Por todo o apoio, carinho e paciência nos momentos difíceis de minha vida. Jamais me esquecerei de tudo de bom que você foi e sempre será em minha vida. Amo você.*

*Ao meu amado **Vinicius**,*

*Pelo amor, incentivo e compreensão em todos os momentos de alegria e de dificuldades compartilhados durante este percurso. Ao meu querido companheiro e melhor amigo deixo aqui declarado meu eterno amor.*

*A vocês, minhas fontes de felicidade e esperança,  
minha eterna gratidão.*

*Dedico*

A amizade torna os fardos mais leves,  
Porque os divide pelo meio,  
A amizade intensifica as alegrias, elevando-as  
Ao quadrado na matemática do coração.  
A amizade esvazia o sofrimento,  
Porque a simples lembrança do amigo é alívio.  
A amizade ameniza as tarefas difíceis,  
Porque a gente não as realiza sozinho.  
São dois cérebros e quatro braços agindo.

A amizade diminui a distância.  
Embora longe, o amigo é alguém perto de nós.  
A amizade coloca música e poesia na banalidade do cotidiano.  
A amizade enseja confidências redentoras:  
Problemas partilhados, percalço amaciado,  
Felicidade repartida, ventura acrescida.  
A amizade é a doce canção da vida e a poesia da eternidade.  
O amigo é a outra metade da gente.  
O lado claro e melhor.  
Sempre que encontramos um amigo,  
Encontramos um pouco mais de nós mesmos.  
O amigo revela, desvenda, conforta.  
É uma porta sempre aberta, em qualquer situação.  
O amigo na hora certa é o sol ao meio dia, estrela na escuridão.  
O amigo é a bússola e rota no oceano, porto seguro da tripulação.  
O amigo é o milagre do calor humano que DEUS opera num coração.

Pe. Roque Schneider

*Amigos são como anjos sem asas,  
abençoando nossas vidas com as  
mais preciosas coisas.*

**Em todo tempo ama o amigo;  
e na angústia nasce o irmão.  
Provérbios 17.17**

*Vinícius, Ju Vantini, Flávia,*

*Renata, Agda, Karina,*

*Gustavo, Ju "Doza", Fabrício,*

*Paula, Gislaine, Rafael Homem,*

*Dani, Maria Luiza, Vanessa M.,*

*Paulo Rosa, Tiago e Júlio I, Joice, Lilian, Jaty, Marcelo, Leticia, Regina, Nilson, Mariana, André,*

*Cristiano, Roberto, Vitor, Carminha, Neli, Poliana, Ana Ká, Vanessa "Parpi", Ana Cristina, Rafael M., Andressa, Ju De Antonio, Splinter,*

*Roseli, Izildinha, Júlio II, Profas. Sonia e Maria Inês, Prof. Rinaldo, Profa. Janete, Profa. Durvalina, Soninha, Prof. Miguel, Léo, Leandro,*

*Maionese, David, Gi e Eduardo, Flávia, Eduardo, Diane, Adão, Rafaella, Vanessa, "Bolasão", Gisela B., Marco, Adriano, Juliana Rossi,*

*Lucília, Rachel, Fabiana, Rafael Heck, Nádia, Paula, Toninho,*

*Thaiza, Jordano, Tiko, Adriana, Noli, Rogina, Graça, Vlad*

*Profa. Maria Cristina, França, Sandra, Nenê, Jehuni,*

*Marisa, Tonhão, Dona Maria (cobra), Boty, Renata,*

*Sr. Antonio, Pablo, Flávia, Márcia, Rui, Roberto,*

*e a todos aqueles cujos nomes embora não*

*estejam presentes aqui, permanecerão*

*eternamente na lembrança.*

*Amigos, Mestros e Colegas, obrigada pelo rico aprendizado.*

*A vocês..*

*Agradeço*

## **AGRADECIMENTOS**

- Agradeço a DEUS, Pai e amigo incondicional, por compreender-me em todas as minhas dificuldades e por permitir-me tantos aprendizados durante o convívio com todos aqui citados.
  
- À minha orientadora, Profa. Dra. Sônia Marli Zingaretti Di Mauro pela orientação e confiança, incentivo e amizade, fundamentais para a minha formação acadêmica e crescimento pessoal.
  
- À profa. Dra. Maria Inês T. Ferro, que me possibilitou crescimento profissional e pessoal graças às oportunidades concedidas sempre com confiança, apoio, conselhos e amizade.
  
- À UNESP (Jaboticabal), ao coordenador (Prof. Dr. Rinaldo) e demais professores do Programa de Pós-Graduação (Genética e Melhoramento de Plantas) pela importante contribuição no aperfeiçoamento de minha formação profissional.

- À USP (Ribeirão Preto) por iniciar-me em minha formação profissional.
  
- A todos os queridos e inesquecíveis amigos da XXXV turma de Biologia (2001) e aqueles cuja convivência durante minha vida acadêmica em Ribeirão Preto enriqueceu-me de lindas e inesquecíveis lembranças.
  
- À minha querida e inesquecível amiga, Idalete Silva, pela preciosa amizade.
  
- Aos profs. componentes da banca de qualificação: Dra. Janete Aparecida Desidério Senna e Dr. Júlio Cezar Franco de Oliveira, pela disponibilidade em participar da banca de qualificação e pelas importantes sugestões que muito contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho e de minha formação.
  
- Aos profs. componentes da comissão examinadora: Dra. Maria Inês T. Ferro e Dr. Renê de Oliveira Beleboni, pela disponibilidade em participar da banca visando o aperfeiçoamento deste trabalho e de minha formação.
  
- Ao pesquisador Renê de Assis Sordi (CTC - Centro de Tecnologia Canavieira) pela doação dos toletes de cana-de-açúcar.
  
- À Fabiana Aparecida Rodrigues e à Thaíza G. S. Morceli, que realizaram o ensaio experimental e a coleta do material vegetal, disponibilizando-o para realização de meu trabalho de mestrado.
  
- Ao Dr. Roberto Willians Noda pelos ensinamentos que permitiram a seleção dos clones (ESTs) para a confecção da membrana de macroarranjos e pela amizade.
  
- À Dani, Júlio I, Vanessa Morgan e Taty (Genoma) pela realização das micro-preparações de DNA plasmidial de clones (ESTs) de cana-de-açúcar selecionados para a confecção da membrana de macroarranjos.



- À profa. Dra. Maria Cristina (USP-RP) pela utilização do leitor de fósforo radioativo (Phosphoimager FLA3000-G) e ao pós-graduando Trança e à técnica Sandra pelo auxílio durante o manuseio deste aparelho.
  
- Ao doutorando Marcelo Luiz de Laia pela realização das análises estatísticas, indispensáveis para a interpretação dos dados obtidos pela técnica de macroarranjos.
  
- Ao Nilson, Mariana e Fabrício pela realização da categorização das ESTs, apresentada no presente trabalho.
  
- Aos bioinformatas: Renata, Paula e Fabrício pelos diversos momentos em que me ajudaram direta ou indiretamente neste trabalho e pela amizade.
  
- Às amigas, Daniele, Fabiana, Juliana “Deza”, Rafaela, Regina e Vanessa Vollet, por todos os ensinamentos e, principalmente, pela amizade;
  
- Aos meus “anjos sem asas”, Ju Vantini, Flávia, Renata, Karina e Agda, pela preciosa amizade, solidariedade e infinita paciência.
  
- A todos do C.E.U. e do grupo A.MO.R. que têm me ensinado a conhecer e a trilhar o caminho dos verdadeiros valores da vida, permitindo-me assim redescobrir a Felicidade Divina.
  
- À FAPESP, CAPES E CNPq pelo auxílio financeiro.

*A todos os meus sinceros agradecimentos.*

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xiii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>xiv</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVO</b> .....	<b>3</b>
<b>III. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
3.1 Cana-de-Açúcar.....	4
3.2 Estresses Abióticos: Considerações Gerais .....	5
3.3 Estresse Hídrico.....	7
3.4 Metodologia dos Macroarranjos de DNA .....	8
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
4.1 Material Vegetal .....	10
4.2 Ensaio Experimental: Estresse Hídrico por Supressão de Rega .....	10

4.3	Extração de RNA total de Tecido Foliar de Cana-de-açúcar .....	12
4.3.1	Quantificação do RNA total .....	13
4.3.2	Análise da Integridade do RNA total .....	13
4.4	Levantamento de Clones Similares a Genes de Enzimas de Interesse.....	14
4.5	Confecção de Membranas de Alta Densidade (Macroarranjos) .....	14
4.6	Hibridações .....	15
4.6.1	Síntese da sonda de cDNA .....	15
4.6.2	Pré-hibridação e Hibridação das Membranas de Alta Densidade .....	16
4.6.3	Lavagem das Membranas .....	17
4.7	Exposição das Membranas e Digitalização das Imagens .....	17
4.8	Remoção Da Sonda Para Reutilização Da Membrana .....	18
4.9	Análises das Imagens Digitalizadas.....	18
4.10	Análises Estatísticas .....	19
4.11	Categorização das ESTs .....	20
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>22</b>
5.1	ESTs Diferencialmente Expressas em Cana-de-Açúcar.....	29
5.1.1	Osmoprotetores: ESTs Diferencialmente Expressas .....	42
5.1.2	Terpenos e Hormônios Vegetais: ESTs Diferencialmente Expressas...49	
5.1.3	Defesa Antioxidante: ESTs Diferencialmente Expressas .....	54
5.1.4	Biossíntese de Fenilpropanóides: ESTs Diferencialmente Expressas ..57	
5.1.5	Outras ESTs Diferencialmente Expressas .....	59
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
	Referências de Web Site .....	74
<b>APÊNDICE:</b>	<b>Reagentes e Soluções.....</b>	<b>75</b>

## **EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DURANTE DÉFICIT HÍDRICO EM DUAS CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**RESUMO** - A cultura da cana-de-açúcar é de grande importância econômica nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente para alguns países da América, como o Brasil, que é atualmente o maior produtor mundial. Estresses abióticos, como a seca, podem reduzir os rendimentos das lavouras. Sendo assim, a identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca são fundamentais no desenvolvimento de novas cultivares comerciais mais tolerantes ao déficit hídrico. O objetivo deste trabalho foi identificar, através da técnica de macroarranjos de cDNA, o perfil de expressão de genes pertencentes a diferentes vias metabólicas em folhas de duas cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp), uma tolerante ao estresse por déficit hídrico (SP83-2847) e outra sensível (SP90-1638) submetidas a dois períodos de restrição no fornecimento de água, ocasionando um estresse por déficit hídrico leve (T1) e severo (T2). Por meio das análises dos resultados foi possível identificar, na cultivar tolerante, a indução de ESTs (etiquetas de seqüências expressas) com similaridade a genes de enzimas de síntese de osmoprotetores, tais

como prolina, hidroxiprolina e GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico); de hormônios vegetais como o ácido abscísico (ABA) e o ácido jasmônico (JA) e repressão de ESTs similares aos genes das enzimas de biossíntese de amido, de glicina betaína e de algumas enzimas do sistema de defesa antioxidante. Ao passo que, na cultivar sensível foram induzidas ESTs similares aos genes de enzimas de síntese dos osmoprotetores trealose e glicina betaína; do sistema de defesa antioxidante e reprimidas ESTs com similaridade a genes das enzimas de síntese de prolina, hidroxiprolina e GABA e envolvidas na biossíntese de ABA e de jasmonatos. Em ambas as cultivares, ESTs similares a genes de diferentes enzimas fotossintéticas foram reprimidas.

**Palavras-Chave:** biologia molecular, estresse por seca, etiquetas de seqüência expressa (EST), macroarranjo de cDNA, *Saccharum* spp

#### **DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION DURING WATER DEFICIT IN TWO CULTIVARS SUGARCANE**

**SUMMARY** - Sugarcane crop is of large economic importance in the tropical and subtropical regions, especially in some countries of Central and South America as Brazil, which is actually the major worldwide producer. Abiotic stress, such as drought, can reduce yield of the farmings. Thus, identification and understanding of the drought tolerance mechanisms is crucial to the development of new commercial cultivars more tolerant to water deficit. The aim of this study was to identify, using cDNA macroarrays technique, expression profile of genes involved in distinct metabolic pathways in leaves of two sugarcane (*Saccharum* spp) cultivars, one water stress tolerant (SP83-2847) and another water stress sensitive (SP90-1638) which were submitted to periods of withhold watering occasioning a mild (T1) and severe (T2) water deficit stress. Through the analysis of the results, it was identified in the tolerant cultivar up-regulated ESTs similar to genes of enzymes involved in the synthesis of osmoprotectants, such as proline, hydroxyproline, GABA ( $\gamma$ -amino butyric acid), of synthesis of plant hormones as abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA);

and down-regulated ESTs similar to genes of enzymes of the biosynthesis of starch, glycine betaine and of some enzymes involved antioxidant defense system. In the other hand, ESTs similar to genes of enzymes involved in the biosynthesis of the osmoprotectants as trehalose and glycine betaine and enzymes from the antioxidant defense system were induced as well as were down-regulated ESTs similar to genes of enzymes of synthesis of proline, hydroxyproline and GABA and involved in biosynthesis of ABA and jasmonates, for the sensitive cultivar. In both cultivars, ESTs with similarity to genes of different photosynthetic enzymes were repressed.

**Keywords:** molecular biology, drought stress, expressed sequence tags (EST), cDNA macroarray, *Saccharum spp*

## I. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar é de grande importância nas regiões tropicais e subtropicais, sendo de especial significado econômico para alguns países da América Central e do Sul, principalmente para o Brasil, que é o maior produtor mundial (SACILOTO, 2003).

A produtividade da cana-de-açúcar é regulada por diversos fatores de produção, dentre os quais se destacam: a cultivar, o solo (propriedades químicas, físicas e biológicas), o clima (umidade, temperatura, insolação), as práticas culturais (controle da erosão, plantio, erradicação de plantas invasoras, descompactação do solo), o controle de pragas e doenças, a colheita (maturação, corte, carregamento e transporte), entre outros (ORLANDO FILHO *et al.*, 1994).

Em ambientes naturais e agricultáveis, as plantas freqüentemente crescem sob condições desfavoráveis, tais como a seca, a salinidade, o resfriamento, o congelamento, a alta temperatura, o alagamento ou a intensa luminosidade. Estas condições são coletivamente chamadas de estresses abióticos e qualquer uma delas pode retardar o crescimento e o desenvolvimento, reduzir a produtividade e, em

casos extremos, levar a planta à morte (QIANG *et al.*, 2000; JIANG & ZHANG, 2002; OZTURK *et al.*, 2002; XIONG *et al.*, 2002).

A baixa disponibilidade de água é um dos principais fatores que influencia na produtividade da cultura (BRUCE *et al.*, 2002; KOTCHONI & BARTELS, 2003; KOSMAS *et al.*, 2005). Dessa forma, a identificação dos mecanismos de tolerância à seca são fundamentais no desenvolvimento de novas cultivares comerciais mais tolerantes ao déficit hídrico (TAYLOR, 1996), as quais são essenciais para a manutenção da produção agrícola brasileira e mundial. Todavia, é necessária a compreensão de que a tolerância à seca em plantas não é uma característica simples, mas sim um complexo de mecanismos que trabalham em conjunto ou isoladamente para evitar ou tolerar períodos de déficit hídrico (CASAGRANDE *et al.*, 2001).

Nas células vegetais, em resposta ao estresse, ocorrem mudanças na expressão gênica. A resposta é iniciada quando a planta reconhece o estresse em nível celular. A partir do reconhecimento do estresse, vias de transdução de sinal são ativadas, as quais, por sua vez, transmitem a informação dentro de células individuais e da planta inteira (BRAY *et al.*, 2000). Mudanças na expressão gênica são fundamentais nas respostas a curto e longo prazo que ocorrem durante o déficit hídrico. No entanto, a expressão de alguns genes durante o estresse pode não garantir necessariamente habilidade da planta em sobreviver ao estresse, ou seja, pode ser simplesmente resultado de estresses secundários e/ou injúrias. Outros genes induzidos podem ter uma função adaptativa (BRAY, 1993; BRAY, 2002; NEPOMUCENO, 2000), embora a repressão gênica também pode estar ligada ao aumento da tolerância ao estresse.

Genótipos que diferem em tolerância ao déficit hídrico devem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas na expressão gênica quando submetidos a períodos de seca. Essas considerações reforçam a necessidade de um enfoque sistemático nos estudos de estresse hídrico, com maior ênfase nas diferenças genéticas entre os genótipos (CASAGRANDE *et al.*, 2001; NEPOMUCENO *et al.*, 2001).

Aliando-se a disponibilidade das bibliotecas de cDNA com a robótica de alta precisão na deposição de pequenas amostras em superfícies sólidas, tornou-se possível a preparação dos “arrays” (arranjos) de clones de cDNA em membranas de náilon ou em lâminas de vidro (PASSOS & JORDAN, 1999), propiciando uma nova abordagem nos estudos da regulação gênica, viabilizando o monitoramento dos níveis de transcritos de um grande número de genes simultaneamente (FELIX *et al.*, 2002).

Sendo assim, este estudo analisou, através da técnica de macroarranjos de cDNA, o perfil de expressão de genes pertencentes a diferentes vias metabólicas e, possíveis genes relacionados ao mecanismo de tolerância ao déficit hídrico foram descritos.

## **II. OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo identificar, através da técnica de macroarranjos de cDNA, o perfil de expressão de ESTs similares a genes de diferentes vias metabólicas em folhas de duas cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp), sendo uma tolerante ao estresse por deficiência hídrica (SP83-2847) e outra, sensível (SP90-1638), as quais foram submetidas a dois períodos de supressão de rega, ocasionando um estresse por déficit hídrico leve (T1) e severo (T2).



### III. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar, uma monocotiledônea alógama e semi-perene, pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*. É originária do Sudeste Asiático, na grande região central da Nova Guiné e Indonésia, sendo que a maioria das cultivares comerciais é originária do cruzamento inter-específico de *Saccharum officinarum* com outras espécies do gênero, tais como *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barbieri* e *S. edule* (SACIOTO, 2003).

A cultura da cana-de-açúcar é de grande importância nas regiões tropicais e subtropicais, sendo cultivada em mais de 90 países (FAO; <http://apps.fao.org>). Atualmente, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo ela, no entanto, 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 & SILVA, 2002). Ademais, a agroindústria canavieira é responsável pela geração de muitos empregos diretos e indiretos, 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 de animal entre outros (SACIOTO, 2003).

O sucesso do cultivo da cana-de-açúcar se deve à utilização de cultivares, obtidas por meio de melhoramento genético clássico desenvolvido pelos centros de pesquisa e estações experimentais. Este é um processo relativamente demorado, visto que, dentre as espécies cultivadas, a cana-de-açúcar possui um dos genomas mais complexos, o que dificulta a aplicação de técnicas convencionais de melhoramento nesta planta (VETTORE *et al.*, 2001). Entretanto, o seqüenciamento do genoma e/ou do transcriptoma de várias plantas, tal como a cana-de-açúcar, vem facilitando e acelerando a identificação de genes responsáveis por qualidades desejáveis, tornando possível a manipulação subsequente de genes de interesse através de técnicas de genética molecular. Tais avanços possibilitarão, cada vez mais, a obtenção de cultivares resistentes a doenças, mais adaptadas e produtivas, diminuindo as perdas na agricultura, além de permitir o aproveitamento de solos até então não utilizáveis (SACIOTO, 2003).

### **3.2 Estresses Abióticos: Considerações Gerais**

O estresse refere-se a um desvio das condições ótimas para a vida e induz mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes (LARCHER, 2004). Em condições naturais e agricultáveis, as plantas estão freqüentemente expostas às condições de múltiplos estresses, tais como a seca, a elevada salinidade, a alta temperatura, as inundações e a intensa luminosidade (CHEN & MURATA, 2002;

RIZHSKY *et al.*, 2004), as quais limitarão seu desenvolvimento e suas chances de sobrevivência. Estes estresses, por sua vez, desempenham um papel importante na determinação de como o solo e o clima limitam a distribuição de espécies vegetais (BRESSAN, 2004; VERSLUES *et al.*, 2006).

Espécies ou variedades de plantas diferem em termos de seu ambiente ótimo e de sua suscetibilidade a diferentes tipos de estresse. Alguns trabalhos preferem considerar como estressantes, apenas ambientes que danificam as plantas e causam mudanças qualitativas, enquanto outros consideram que em um sistema estressado, a energia consumida aumenta ou a energia potencial do sistema decresce. A maior dificuldade, no entanto, no estudo dos mecanismos envolvidos na resposta e/ou tolerância a um dado estresse, é que os fatores de estresse normalmente não operam isolados: as interações e co-variações são comuns no ambiente natural (STEFANUTO, 2002).

O estresse pode se manifestar em vários graus de severidade, com duração variável, combinados ou não, de modo contínuo ou alterando com momentos de normalidade. No que concerne às plantas, a intensidade do estresse vai depender do órgão ou do tecido alvo, do estágio de desenvolvimento da planta e do genótipo em questão. Levados em consideração estes fatores, o genótipo pode manifestar resistência ou tolerância, sobrevivendo e, às vezes, até crescendo, mesmo que em menores taxas ou o genótipo pode manifestar suscetibilidade sofrendo redução do crescimento e, dependendo da intensidade do estresse, podendo chegar à morte da planta (CAMBRAIA, 2005).

Os estresses ambientais podem induzir padrões similares de resposta ou de adaptação nas plantas. Algumas dessas respostas podem ser: a produção de compostos osmorreguladores; alterações no metabolismo de carboidratos; redução no crescimento; alterações nas propriedades das membranas celulares e na arquitetura da parede celular; inibição da fotossíntese; aumento da respiração; senescência e abscisão foliar; atuação do ácido abscísico (ABA) como um “hormônio de estresse”, entre outras (STEFANUTO, 2002; YORDANOV *et al.*, 2003; BRESSAN *et al.*, 2004). Uma resposta comum a diferentes tipos de estresses abióticos é o acúmulo de solutos compatíveis, os quais, além de atuarem no ajustamento

osmótico, protegem as estruturas celulares contra os danos induzidos pela desidratação e oxidação. Por essa razão o nome soluto compatível utilizado algumas vezes para designar estes osmólitos não é o mais apropriado devido estes compostos não serem apenas compatíveis, ou seja, não prejudiciais quando em elevada concentração, mas também protetores.

Ademais, a síntese de osmólitos pode ter papéis fisiológicos adicionais. Por exemplo, auxiliando no controle redox por consumir equivalentes redutores. Este consumo pode ser particularmente benéfico durante a desidratação devido este estresse induzir uma perturbação na cadeia de transporte de elétrons e aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir de equivalentes redutores celulares (SERRANO & MONTESINOS, 2003). Os solutos compatíveis que podem ser acumulados diferem dentre as espécies vegetais e podem incluir betaínas e compostos relacionados, açúcares, tais como manitol, sorbitol e trealose e aminoácidos, tais como prolina e hidroxiprolina (CHEN & MURATA, 2002).

### **3.3 Estresse Hídrico**

O estresse hídrico resulta da deficiência hídrica ou do excesso de água no ambiente, sendo o primeiro mais comum. Não há um processo vital que não seja afetado de alguma forma pelo declínio do potencial hídrico (TAYLOR, 1996; LARCHER, 2004). O estresse por déficit hídrico, diminui o potencial hídrico do solo interferindo diretamente na eficiência do uso da água pelas plantas, as quais necessitam então desenvolver um potencial hídrico mais negativo que o do solo, de modo a manter um gradiente de potencial hídrico entre o solo e a planta (TAIZ & ZEIGER, 2004).

O decréscimo de água no solo diminui o potencial de água na folha e sua condutância estomática, promovendo o fechamento dos estômatos (YORDANOV *et al.*, 2003). Esse fechamento bloqueia o influxo de CO<sub>2</sub> para as folhas, diminuindo o acúmulo de fotoassimilados, o que implica na redução da produtividade, sendo a deficiência hídrica, portanto, uma das maiores causas de redução na produtividade

agrícola no mundo (SANTOS & CARLESSO, 1998; PIMENTEL & HÉBERT, 1999; OBER & LUTERBACHER, 2002).

Ademais, as plantas sob déficit hídrico apresentam uma diminuição do volume celular, um aumento na concentração de solutos e uma progressiva desidratação do protoplasma, sendo que, a primeira e mais sensível resposta ao déficit hídrico é a diminuição da turgescência e, associada a esse evento, a diminuição do processo de crescimento, particularmente, do crescimento em extensão (LARCHER, 2004). Sendo assim, a desidratação causa mudanças fisiológicas e bioquímicas nas plantas, tais como diminuição nas atividades fotoquímicas, redução da fixação de CO<sub>2</sub>, acúmulo de osmólitos e osmoprotetores e alteração no metabolismo de carboidratos (LIU & BAIRD, 2003). Uma perda acima de 30% de água causa um aumento gradual da taxa de respiração, que poderá exceder a taxa de fotossíntese desencadeando um processo de inanição na planta, devido ao decréscimo das reservas de carboidratos (STEFANUTO, 2002). Entretanto, estudos recentes em espécies de *Populus* têm verificado um aumento da síntese de sacarose e outros açúcares solúveis, em resposta ao estresse hídrico, assim como acúmulo de proteínas de estresse hídrico e sacarose sintase (PELAH *et al.*, 1997).

Em termos moleculares, o sinal de estresse, uma vez produzido pela célula vegetal, deve ativar uma rota de transdução que envia esta mensagem aos fatores de transcrição, que regulam a expressão dos genes encarregados da resposta ao estresse. A perda do volume e da turgescência celular ou a concentração de solutos altera a conformação de proteínas da parede celular e da membrana plasmática da célula vegetal, ativando rotas de transdução de sinais que dão lugar à expressão de determinados genes, transformando assim o fenômeno físico do déficit hídrico em uma resposta bioquímica (WILLIADINO & CAMARA, 2005).

A maior limitação para o melhoramento genético visando à tolerância ao déficit hídrico em plantas é o conhecimento insuficiente sobre as bases fisiológicas, moleculares e genéticas das respostas das plantas ao déficit. Uma resposta fisiológica específica ao déficit hídrico representa na verdade combinações de eventos moleculares que são ativados ou desativados pela percepção do estresse. Compreender como tais eventos interagem entre si representa um importante passo

no desenvolvimento de plantas com maior tolerância à seca. Dessa maneira, a biologia molecular assume papel-chave na identificação pontual de genes e de rotas metabólicas envolvidos nas respostas fisiológicas à seca (CASAGRANDE *et al.*, 2001).

### **3.4 Metodologia dos Macroarranjos de DNA**

Sabe-se, que o fluxo da informação gênica do DNA (genoma) até o proteoma é intermediado pelo conjunto das moléculas de RNA (transcriptoma). Assim, a concentração relativa dos transcritos de um determinado gene em uma célula é um indicativo do quanto esse gene está sendo expresso, em virtude de um dado estímulo ambiental. O desenvolvimento dos arranjos de DNA tornou possível o monitoramento dos níveis de transcritos de um grande número de genes simultaneamente (FELIX *et al.*, 2002).

Os macroarranjos de DNA estão permitindo a identificação de rotas metabólicas ativadas ou desativadas, assim como a visualização das centenas de interações que ocorrem, em âmbito transcricional, em resposta a eventos fisiológicos diversos. Com isso, está sendo possível delinear estratégias que visem aumentar a tolerância às condições de estresse ambiental. Essas estratégias vão desde métodos tradicionais de melhoramento genético, facilitado pelo uso de marcadores moleculares, até o uso da engenharia genética (NEPOMUCENO *et al.*, 2001).

O genoma funcional da cana-de-açúcar realizado por meio do seqüenciamento de cDNAs (ESTs) sintetizados a partir do *pool* de genes expressos em diferentes situações, cada uma constituindo uma biblioteca, possibilitou a construção de um banco de dados contendo aproximadamente 238.000 ESTs (*Expressed Sequence Tags* ou Etiquetas de Seqüências Expressas), geradas pelo projeto SUCEST (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br>) da rede ONSA (*Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis*) – FAPESP. Essas ESTs de cana-de-açúcar, oriundas do seqüenciamento de clones das 26 bibliotecas de cDNA, representam genes expressos em seus diferentes órgãos, tais como raiz, colmo, folhas, flores e sementes; em vários estágios de desenvolvimento e; em resposta à variações

ambientais diversas incluindo interações com bactérias (VETTORE *et al.*, 2001; VETTORE *et al.*, 2003).

O estudo com macroarranjos de cDNA, contendo os inúmeros clones de genes de cana-de-açúcar, é um grande trunfo para o avanço científico e tecnológico da pesquisa nacional (SOUZA & DA SILVA, 2002), permitindo a associação desses genes, quando diferencialmente expressos, a funções no crescimento e no desenvolvimento, nas respostas a diversos tipos de estresses, bem como nas mais variadas condições testadas. A partir dessas análises, esses genes poderão ser utilizados em cana-de-açúcar, através de manipulações genéticas, para a geração de cultivares com um maior número de características economicamente desejáveis.

#### **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Campus de Jaboticabal.

##### **4.1 Material Vegetal**

Foram utilizados, no presente estudo, toletes de duas cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp), sendo uma classificada como tolerante ao estresse por déficit hídrico (cv SP83-2847) e a outra sensível (cv SP90-1638). Esta classificação se deve a estudos realizados no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), através da análise do peso seco de raiz e parte aérea, após o cultivo em casa de vegetação sob condições de deficiência hídrica. As cultivares foram obtidas junto ao CTC, através de colaboração estabelecida com o pesquisador René de Assis Sordi.

##### **4.2 Ensaio Experimental: Estresse Hídrico por Supressão de Rega**

O experimento foi instalado em casa de vegetação (Depto. de Tecnologia da FCAV/UNESP), com temperatura e umidade controladas. Os toletes foram cultivados durante 39 dias em bandejas plásticas com areia grossa esterilizada e regas periódicas, sendo posteriormente transplantadas para vasos de 10L contendo o mesmo substrato. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado.

A condução do experimento se deu por 56 dias com regas diárias com solução nutritiva de Hoagland 25% (apêndice) até o ponto de início da suspensão da rega. A quantidade de solução utilizada durante as irrigações foi determinada por meio de um atmômetro de *Livingstone*, que simula a evapotranspiração da lâmina foliar da planta (BRONER & LAW, 1991). Este aparelho (evaporímetro) consiste de uma esfera oca de porcelana porosa, com cinco cm de diâmetro e parede de três mm de espessura, conectada por um tubo a um reservatório contendo água destilada. Esta esfera oca, revestida por um tecido verde, simula a transpiração da lâmina foliar, e a quantidade de água evaporada é determinada em milímetros (mm) pela variação do volume de água no reservatório (SALASSIER, 1995). Através de um cálculo realizado com o valor obtido no atmômetro, a quantidade de água perdida pela planta foi repostada diariamente por meio da irrigação.

Durante o desenvolvimento da planta, manteve-se o substrato na condição de umidade próxima de sua capacidade de campo, determinada no laboratório do Depto. de Engenharia Rural (FCAV/UNESP), através da curva de retenção de água no solo.

No 57º dia, deu-se início aos tratamentos de supressão de rega, simulando dois níveis de deficiência hídrica determinados com base na duração do tempo da supressão da irrigação:

- 1º Tratamento (T1): Déficit Hídrico Leve, e
- 2º Tratamento (T2): Déficit Hídrico Severo.



Cada tratamento apresentava dois grupos: um de plantas sem irrigação e outro de plantas-controle, sendo cada um composto por três repetições de forma a se ter uma maior confiabilidade dos resultados. A primeira coleta (T1) se deu após 24 horas de supressão da rega e, a segunda coleta (T2) após 10 dias de supressão da irrigação (T2). As amostras de tecido foliar, após a coleta, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas em Ultra-Freezer (-80°C) até a realização dos ensaios moleculares.

Na ocasião, foram coletadas também amostras de substrato de cada vaso para verificação do percentual de umidade nos períodos de coleta. Tendo em vista o objetivo deste trabalho foi de fundamental importância à determinação da umidade do solo. Portanto, para analisar a disponibilidade de água no solo para a planta, utilizou-se o método-padrão de estufa (gravimétrico).

As amostras de solo, coletadas nos dois períodos de suspensão de rega, foram pesadas ( $P_U$ ) e transferidas para estufa a 105°C. Após 24 horas as amostras foram pesadas novamente para obtenção de seu peso seco ( $P_S$ ). Dessa maneira pode-se calcular a porcentagem de umidade em peso através da seguinte equação:

$$\% U = \frac{P_U - P_S}{P_S} \times 100$$

Em que:  $U$  = umidade;  
 $P_U$  = peso úmido;  
 $P_S$  = peso seco.

#### **4.3 Extração de RNA total de Tecido Foliar de Cana-de-açúcar**

O RNA total foi isolado de tecido foliar das plantas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico leve e severo e das respectivas plantas-controle, utilizando-se Trizol (Invitrogen, *Life Technologies*), conforme descrito pelo fabricante.

Para a extração de RNA total, todos os utensílios utilizados foram limpos em água deionizada tratada com dietilpirocarbonato - DEPC (0.01% v/v) e

posteriormente mantidos a 180°C por duas horas, de forma a inibir a ação de RNAses. De igual modo, todas as soluções foram preparadas com água livre de RNase (tratada com DEPC 0.01% v/v), conforme recomendado por SAMBROOK *et al.* (1989).

- Para cada amostra, 1,6 g de tecido foliar macerado em N<sub>2</sub> líquido foi homogeneizado em 8,0 mL do reagente TRIZOL;
- As amostras homogeneizadas foram incubadas por cinco minutos à temperatura ambiente (aproximadamente 23°C), permitindo assim a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas;
- Adicionou-se à solução, 1,6 mL de clorofórmio (0,2 mL de clorofórmio para cada 1,0 mL do reagente Trizol), com subsequente agitação vigorosa e então incubada por 3 minutos a temperatura ambiente;
- Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g a temperatura de 4°C durante 15 minutos. O volume do sobrenadante (fase superior) foi transferido para um novo tubo;
- A precipitação do RNA total foi realizada com a adição de álcool isopropílico (adição de 0,6 mL de álcool isopropílico por 1,0 mL de solução da fase superior) e incubando-a por 10 minutos a temperatura ambiente;
- Posteriormente, foi centrifugada a 12.000 X g durante 15 minutos à 4°C. O RNA precipitado, até então invisível, formou um precipitado de RNA total (pellet) gelatinoso no fundo do tubo;
- O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,0 mL de álcool etílico à 75%. O precipitado foi ressuspenso utilizando-se um vortex e, posteriormente, realizou-se a centrifugação a 8.000 x g a 4°C durante 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Este processo foi repetido novamente para garantir a remoção de todo o sal remanescente;
- Por fim, o precipitado de RNA total foi ressuspenso em água livre de RNase (tratada com DEPC) e armazenado a - 80°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, na diluição de 1:100 v/v. As medidas de absorvância foram realizadas nos comprimentos de onda de 260 e 280nm, cuja relação entre as leituras 260/280nm fornece uma estimativa de pureza do ácido nucléico (SAMBROOK *et al.*, 1989).

#### **4.3.2 Análise da Integridade do RNA total**

Para verificar a integridade das amostras de RNA total, 2,0 µL de RNA total de cada amostra foi seco em bomba a vácuo e ressuspendido em 18,0 µL de uma mistura composta por tampão de amostra (apêndice), brometo de etídeo (10mg/mL) e água-DEPC. Esta mistura foi posteriormente aquecida em banho-maria a 65°C por 7 minutos antes de sua aplicação em gel de agarose 1,5% (p/v) contendo 6,7% de formaldeído (v/v). O gel foi submetido à eletroforese a 60V constante por cerca de 50 minutos e, em seguida, exposto à luz ultravioleta (UV) em transiluminador e sua imagem captada por uma câmara CCD (EASTMAN KODAK COMPANY; Rochester, New York).

#### **4.4 Levantamento de Clones Similares a Genes de Enzimas de Interesse**

Por meio da utilização de uma ferramenta disponível na área restrita da página SugarCane EST Genome Project (SUCEST; <http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/public>) realizou-se a busca de clones ESTs similares a genes de enzimas de diversas vias metabólicas, tais como de síntese de fenilpropanóides, de isoprenóides e de hormônios vegetais, do metabolismo respiratório e fotossintético, da fotorrespiração, de osmoprotetores, do sistema de defesa antioxidante entre outras. Os clones mais representativos de cada enzima, ou seja, aqueles que apresentavam seqüências contendo o maior número de bases correspondentes ao começo do gene foram selecionados. E, para a confirmação da similaridade das seqüências de nucleotídeos das ESTs destes clones com as dos genes das enzimas de interesse as mesmas foram comparadas, por meio do algoritmo BLAST-X, com às seqüências depositadas

no banco de dados internacional NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), considerando como limiar de aceitação para o BLAST um e-value de  $1.10^{-10}$ .

#### **4.5 Confeção de Membranas de Alta Densidade (Macroarranjos)**

As membranas de alta densidade utilizadas neste trabalho foram confeccionadas no Centro Brasileiro de Estocagem de Clones, BCCCenter (<http://www.bcccenter.fcav.unesp.br>). Para o preparo das mesmas foi utilizado DNA plasmidial de clones das ESTs selecionadas, oriundos de diferentes bibliotecas de cDNA do projeto SUCEST. As amostras de DNA plasmidial foram obtidas por meio de micro-preparação realizada através de lise alcalina (apêndice) em placas de 96 poços.

Foram transferidas 1.202 amostras de DNA plasmidial para membranas de náilon carregadas positivamente (Genetix, UK), através de um sistema robotizado Q-Bot (Genetix, UK). Em um arranjo 3X3, com espaçamento de 900 $\mu$ m entre cada ponto, as amostras foram depositadas em duplicata para maior confiabilidade das análises, perfazendo um total de 2.404 “spots” por membrana. O “spot” central de cada arranjo não recebeu amostra e representou o controle negativo, para o monitoramento de hibridações não-específicas. Após a deposição das amostras de DNA, a membrana foi submetida a um processo de desnaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) e de neutralização (NaCl 1,5 M e Trizma 1,0 M) por um período de 5 e 10 minutos, respectivamente. Posteriormente, o DNA foi fixado à membrana por exposição à luz UV (1.600 joules) (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP), seguindo as recomendações do fabricante (Genetix, UK). Foram utilizadas, no presente trabalho, membranas réplicas, ou seja, membranas contendo os mesmos clones EST transferidos para as mesmas posições.

#### **4.6 Hibridações**

##### **4.6.1 Síntese da sonda de cDNA**

As sondas de cDNA foram sintetizadas seguindo o protocolo descrito por Schummer e colaboradores (1999) com algumas modificações.

- Em um tubo estéril foram adicionados 30 µg de RNA total e 156 pmoles de Oligo (dT<sub>18</sub>VN), resultando em um volume final de 7,5 µL. A mistura foi mantida a 75°C durante 10 minutos e, em seguida, transferida para o gelo;

- Foram adicionados à reação: 5,0 µL de tampão de síntese de primeira fita (5x, BRL); 2,5 µL DTT (100mM); 2,0µL RNAGuard; 2,5 µL de dNTPs (dATP, dGTP e dTTP a 10mM cada); 3µL <sup>33</sup>P-αdCTP (30 µCi) e então incubada durante 5 minutos a 42°C sendo, em seguida, adicionado 1,25 µL da enzima Superscript II (BRL 200U/µL). Após uma rápida centrifugação, a amostra foi incubada por 30 minutos a 42°C;

- Após esse período, foi adicionado 1,25 µL de dCTP sem marcação radioativa (10mM) e a reação novamente incubada a 42°C durante 2 horas. Em seguida, adicionou-se 1,0 µL de Poly-A (2,0 µg/µL) e, a reação foi desnaturada a 94°C por 5 minutos. Após a desnaturação foi adicionado 1,4 µL de NaOH 5 M e a reação incubada a 37°C durante 15 minutos;

- A seguir foram adicionados 1,8 µL HCl 3,94 M e 7,0 µL Tris-HCl 1,0 M pH 7,5. Para a purificação da sonda, o volume da reação foi ajustado para 50 µL com água deionizada e estéril;

- A sonda foi purificada, para a retirada de nucleotídeos livres, aplicando-a em uma coluna Sephadex G-50 equilibrada com STE, a qual foi montada em uma seringa de 1,0 mL contendo lã de vidro siliconizada em sua extremidade inferior (SAMBROOK *et al.*, 1989). Através de centrifugação a 4.000 rpm (centrífuga clínica) durante 4 minutos, o volume eluído da coluna foi recuperado em um novo tubo estéril;

- Em seguida, 100 µL de STE foram adicionados à coluna e, após nova centrifugação a 4.000 rpm durante 4 minutos, o volume eluído foi coletado e adicionado ao obtido anteriormente;

- A incorporação radioativa nas fitas de cDNA (sonda) foi avaliada por meio de um cintilador líquido (Beckman LS6500, USA) e após esta leitura, a sonda foi

desnaturada a 95°C durante 5 minutos e, em seguida, mantida no gelo até o momento de ser adicionada à solução de hibridação nos frascos contendo as membranas.

#### **4.6.2 Pré-hibridação e Hibridação das Membranas de Alta Densidade**

Conforme as recomendações do fabricante, as membranas foram colocadas inicialmente em solução SDS 0,1% fervente para diminuir o background. Sendo que, esta etapa não é mais necessária quando as membranas são reutilizadas. Para as pré-hibridações e hibridações realizadas como descrito em (<http://www.tree.caltech.edu/protocols/overgo.html>) procedeu-se do seguinte modo:

- As membranas foram colocadas em frascos cilíndricos (15 x 3,5cm) contendo a solução de pré-hibridação (apêndice) e incubadas em forno a 58°C, com rotação dos frascos, por 4 horas, durante a primeira utilização das membranas e, por 2 horas, nas mesmas condições, durante as reutilizações;
- Utilizou-se um volume de 10 mL de solução de pré-hibridação por membrana. A solução de pré-hibridação foi mantida nos frascos durante o período de hibridação visto que, a solução de hibridação apresenta a mesma composição que a anterior;
- Após a purificação e desnaturação das sondas, durante 5 minutos a 95°C (descrito no item 4.6.1), elas foram adicionadas nos frascos, contendo as membranas e a solução de pré-hibridação e, então, realizada a hibridação durante 18 horas a 58°C em forno de hibridação Hybaid (Halbrook, NY). Após este período, as membranas foram lavadas.

#### **4.6.3 Lavagem das Membranas**

- Após a hibridação, a solução contendo a sonda radioativa foi devidamente descartada;
- As membranas foram então submetidas a lavagens para remoção do excesso de sonda e de hibridações inespecíficas que ocasionalmente tenham ocorrido. Foram

realizadas três lavagens, de 30 minutos cada, a 58°C, com aproximadamente 200 mL das seguintes soluções:

- 1ª Lavagem: 2X SSC e 0,1% SDS;
- 2ª Lavagem: 1,5% SSC e 0,1% SDS; e
- 3ª Lavagem: 0,5% SSC e 0,1% SDS.

Por fim, antes de serem seladas, as membranas foram passadas para uma solução, a temperatura ambiente, de 2x SSC durante 5 minutos.

#### **4.7 Exposição das Membranas e Digitalização das Imagens**

As membranas foram envolvidas em filme plástico e seladas para exposição em placas sensíveis à radioatividade (Image Plates - FUJIFILM) durante um período de 96 horas. A captação das imagens das membranas foi realizada através de um leitor de fósforo radioativo (Phosphoimager FLA3000-G – FUJIFILM, Tokyo), o qual gerou imagens digitalizadas que foram armazenadas em mídia digital (Compact Disc) para posterior análise.

#### **4.8 Remoção da Sonda para Reutilização da Membrana**

As membranas, utilizadas nos experimentos anteriores de hibridação, passaram por um procedimento de remoção da sonda, de forma a possibilitar sua reutilização. O procedimento se deu da seguinte maneira:

- Duas lavagens a 65°C por período de 15 minutos cada lavagem, com uma solução pré-aquecida (65°C) de 0,4 N NaOH e 0,1% SDS; e
- Em seguida, foram lavadas duas vezes, a temperatura ambiente, por período de 15 minutos cada lavagem, com uma solução de 0,2 N Tris-HCl pH 8,0, 0,1% SDS e 0,1X SSC;
- Por fim, as membranas foram passadas para uma solução de 0,1X SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, envolvidas em filme

plástico e seladas para exposição em placas sensíveis à radioatividade durante 96 horas. Após este período, a eficiência da remoção da sonda foi monitorada repetindo-se o processo de leitura da emissão radioativa através do equipamento de Phosphoimager (FLA3000-G – FUJIFILM, Tokyo).

#### **4.9 Análises das Imagens Digitalizadas**

As imagens digitalizadas, obtidas conforme descrito no item 4.7, foram analisadas usando o software ArrayVision 8.0 (Imaging Research, St. Catherine's, ON, Canada), o qual quantifica o valor da intensidade de sinal emitida em cada um dos "spots", bem como o valor da emissão de sinal emitida pelo background ao redor do respectivo "spot". Da subtração destes valores têm-se os valores líquidos de intensidade emitidos de cada "spot". Todos estes dados foram exportados para uma planilha do programa Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA) para posterior análise estatística.

#### **4.10 Análises Estatísticas**

De modo a se ter todos os valores líquidos de todas as imagens em um único arquivo, os arquivos originais gerados pelo programa ArrayVision tiveram estes valores agrupados em uma única planilha. Em seguida, os dados foram exportados para um arquivo texto delimitado por tab, o qual foi importado para o programa estatístico R (R Development Core Team, 2005; IHAKA & GENTLEMAN, 1996) e procedido às análises utilizando programas desenvolvidos pelo projeto Bioconductor (GENTLEMAN, 2004), mais especificamente os pacotes Limma (SMYTH, 2005), vsn (HUBER, 2002) e geneplotter.

Com a finalidade de tornar possível a comparação entre diferentes experimentos de macroarranjos, a estabilização das variâncias e uma normalização foram aplicadas aos dados. O controle de qualidade foi investigado por meio de gráficos estatísticos apropriados, sendo eles: gráficos da dispersão conjunta das



intensidades após normalização dos dados; diagrama de caixas (boxplots) e histograma de frequências relativas.

Após normalização dos dados, os genes diferencialmente expressos foram obtidos utilizando o pacote Limma. Os “spots” em duplicata para cada gene foram utilizados para maximizar a robustez de cálculo dos genes diferencialmente expressos via a função 'lmFit'. A expressão diferencial de genes foi determinada usando um modelo não linear baseado na análise empírica de Bayes (EB). Após a análise EB, os genes foram classificados como sendo diferencialmente expressos em ordem decrescente do valor B-estatístico (SMYTH, 2005). A fim de diminuir a taxa de descobertas falsas (FDR), o método descrito por Benjamini e Hochberg (1995) foi incorporado nas análises. Finalmente, uma lista de genes-candidatos a expressão diferencial foi gerada usando uma taxa de descobertas falsas (FDR) de 5%, B-estatístico  $>0$  e P-value  $<0.05$  (5%).

Dois tipos de análises estatísticas foram aplicados aos dados obtidos pela técnica de macroarranjos:

- Para cada cultivar de cana-de-açúcar, tolerante e sensível ao déficit hídrico, realizou-se o contraste dos dados da condição de estresse com os dados da condição controle em cada um dos períodos estudados T1 e T2;
- Análise comparativa dos contrastes acima citados, nos períodos T1 e T2.

#### **4.11 Categorização das ESTs**

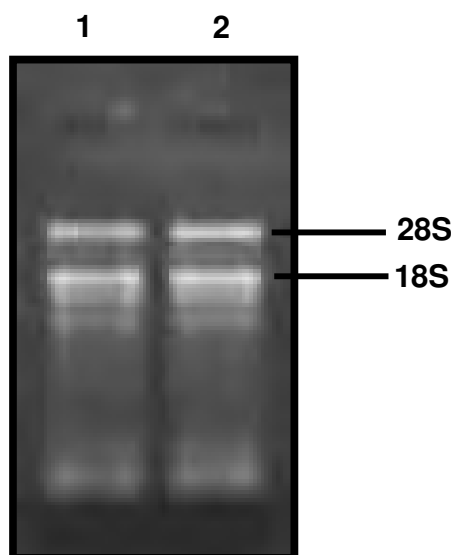
As ESTs presentes na membrana de alta densidade foram agrupadas de acordo com as categorias propostas pelo SUCEST. O agrupamento se deu com base na função biológica exercida pela proteína. O SUCEST considera 18 categorias para função protéica. Seguem-se abaixo tais categorias (**Tabela I**):

<b>Tabela I. Categorização das ESTs de Cana-de-açúcar</b>		
<b>CATEGORIAS</b>	<b>Nº CLONES</b>	<b>%</b>
[SC.2] Bioenergética	390	32,45
[SC.13] Metabolismo Secundário	149	12,40
[SC.1] Metabolismo de Aminoácido	128	10,65
[SC.15] Resposta a Estresse	92	7,65
[SC.18] [Sem Classificação]	85	7,07
[SC.11] Metabolismo de Proteínas	59	4,91
[SC.17] [Proteína Hipotética]	54	4,49
No Hits	49	4,08
[SC.4] Dinâmica Celular	47	3,91
[SC.6] Metabolismo de Isoprenóides, Lipídios e Ácidos Graxos	35	2,91
[SC.3] Comunicação Celular/Transdução de Sinal	26	2,16
[SC.12] Metabolismo de RNA e Transcrição	22	1,83
[SC.10] Crescimento e Desenvolvimento Vegetal	18	1,50
[SC.16] Transporte	14	1,16
[SC.9] Metabolismo de Nucleotídeos	13	1,08
[SC.8] Metabolismo de Nitrogênio, Enxofre e Fosfato	08	0,67
[SC.7] Elementos Genéticos Móveis	06	0,50
[SC.14] Proteínas de Armazenamento	05	0,42
[SC.5] Metabolismo de DNA	02	0,17
<b>TOTAL</b>	<b>1202</b>	<b>100,00</b>

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de macroarranjos de cDNA foi empregada com o objetivo de identificar o padrão de expressão gênica, durante períodos de déficit hídrico, em duas cultivares de cana-de-açúcar, sendo uma tolerante (SP83-2847) e outra sensível (SP90-1638) ao estresse causado pela deficiência hídrica. Usando-se clones de cDNA oriundos do projeto SUCEST (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br>), foram confeccionadas membranas de alta densidade contendo 1.202 clones ESTs, perfazendo um total de 2.404 “spots” por membrana.

Amostras de RNA total de tecido foliar das duas cultivares de cana-de-açúcar, extraídas após dois períodos de supressão de rega e em seus respectivos controles, foram utilizadas na síntese das sondas de cDNA marcadas com  $^{33}\text{P}$ - $\alpha\text{dCTP}$  para emprego nas análises de macroarranjos. Após a quantificação do RNA total por meio de avaliação por espectrofotometria, 2,0  $\mu\text{L}$  de cada uma das amostras foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (condições desnaturantes) para verificação da integridade do RNA total através da visualização das bandas 28S e 18S de RNA ribossomal (**Figura 1**).



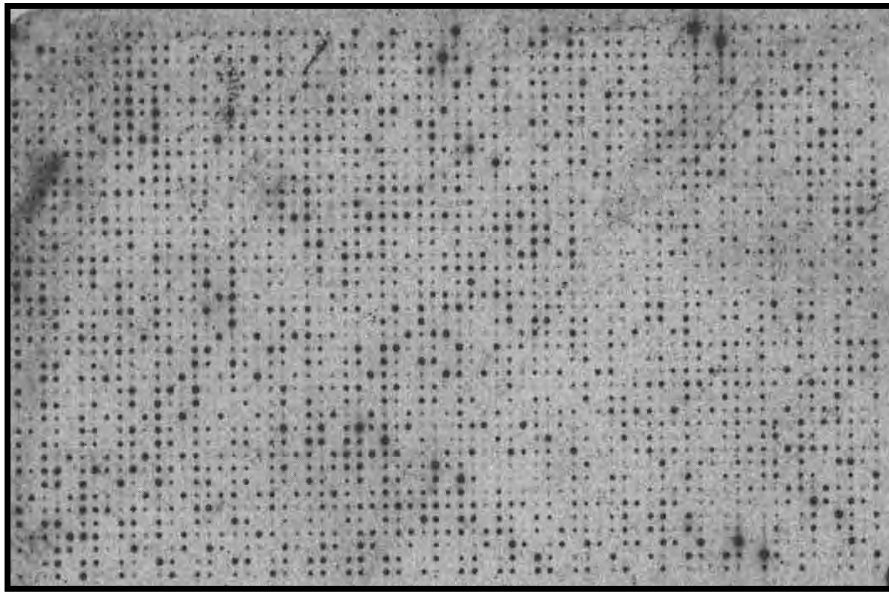
**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% em condições desnaturantes. Em cada canaleta foi aplicado 2,0 $\mu\text{L}$  de RNA total, extraído de tecido foliar de cana-de-açúcar (1) cultivar tolerante ao déficit hídrico (SP83-2847) e (2) cultivar sensível (SP90-1638) ao déficit hídrico, ambas sob supressão de rega. Estão indicadas as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S.

A quantificação e análise da qualidade do RNA total extraído são necessárias, uma vez que a eficiência do processo de hibridação é influenciada por diversos parâmetros experimentais, em especial, pela qualidade e quantidade de RNA utilizado na síntese da sonda de cDNA (FELIX *et al.*, 2002).

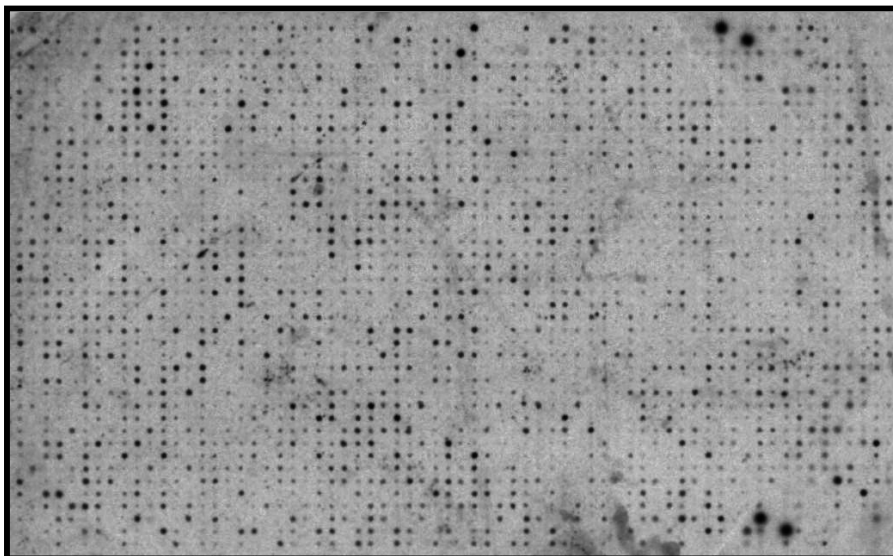
Para cada cultivar de cana-de-açúcar, os padrões de expressão gênica de 1.202 clones ESTs selecionados a partir de bibliotecas de cDNA de cana-de-açúcar foram avaliados entre plantas submetidas ao estresse por déficit hídrico e plantas controle. A estratégia possibilitou a identificação das alterações na expressão gênica inicial e tardia durante a resposta da planta ao déficit hídrico. Plantas controle foram incluídas para eliminar o efeito de genes que são normalmente expressos e que devem ser regulados da mesma maneira nas plantas sob estresse e controle. Experimentos em triplicata foram conduzidos para selecionar genes comumente induzidos e reprimidos na situação estudada.

As **figuras 2 e 3** ilustram as imagens digitalizadas de duas membranas de náilon, exemplificando o perfil de expressão diferencial das cultivares tolerante (SP83-2847) e sensível (SP90-1638), respectivamente. É possível observar que a hibridação não ocorreu em todos os “spots”, bem como há “spot” com maior e menor intensidade de sinal, demonstrando a diferença na expressão destes clones.

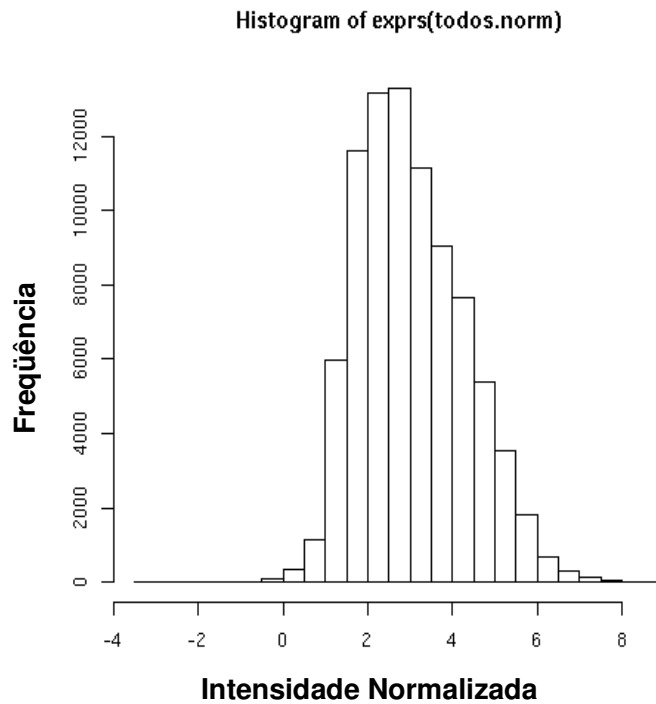
Após a hibridação das membranas, os sinais radioativos emitidos pelos clones ESTs foram quantificados através do programa ArrayVision 8.0 (Imaging Research, Canada) e os dados numéricos obtidos foram transformados em logaritmo na base 2, de forma a torná-los dados paramétricos. A fim de possibilitar a comparação entre diferentes experimentos de macroarranjos, a estabilização das variâncias e uma normalização foram aplicadas aos dados através do pacote vsn. Com o pacote Geneplotter, o controle de qualidade foi investigado por meio de gráficos estatísticos apropriados, sendo eles: histograma de freqüências relativas (**Figura 4**), diagrama de caixas (boxplots) (**Figura 5**) e gráficos da dispersão conjunta das intensidades após normalização dos dados (**Figuras 6 e 7**). E, os genes diferencialmente expressos foram obtidos utilizando o pacote Limma. Todos estes pacotes foram desenvolvidos pelo projeto Bioconductor ([www.bioconductor.org/](http://www.bioconductor.org/)).



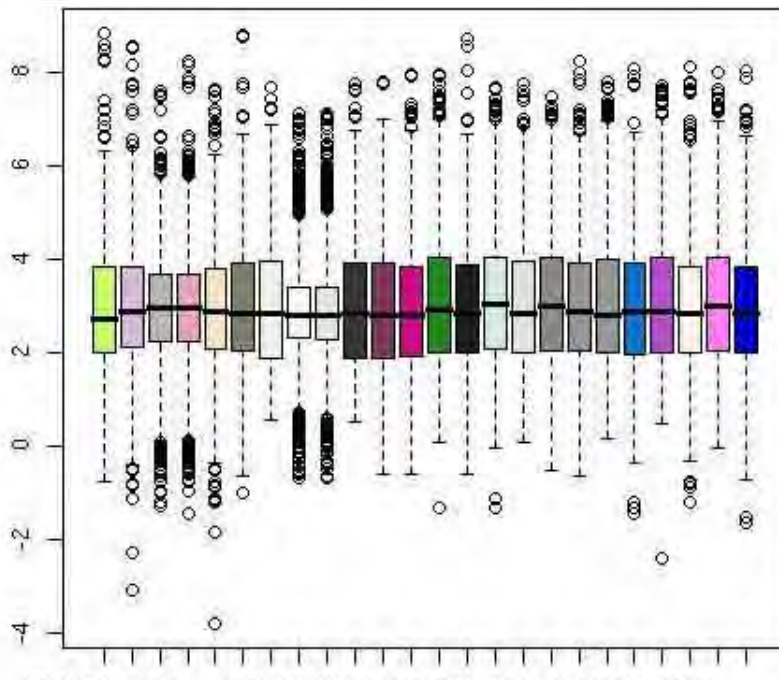
**Figura 2.** Imagem digitalizada de membranas de náilon, contendo 1.202 clones ESTs em duplicata, oriundos de DNA plasmidial de diferentes bibliotecas geradas pelo projeto SUCEST e hibridada com sonda marcada com  $\alpha$ -<sup>33</sup>P, produzida a partir de 30 $\mu$ g de RNA total de tecido foliar da **cultivar tolerante (SP83-2847)** de cana-de-açúcar submetida à supressão de rega.



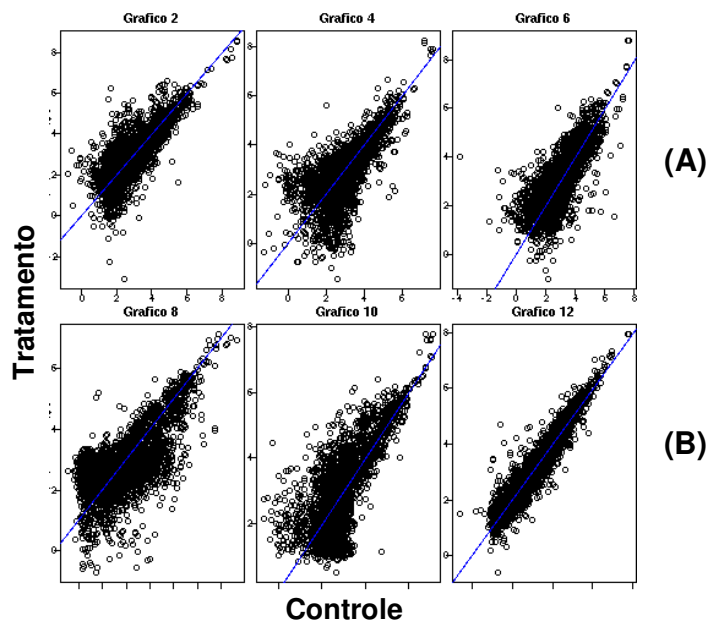
**Figura 3.** Imagem digitalizada de membranas de náilon, contendo 1.202 clones ESTs em duplicata, oriundos de DNA plasmidial de diferentes bibliotecas geradas pelo projeto SUCEST e hibridada com sonda marcada com  $\alpha$ -<sup>33</sup>P, produzida a partir de 30 $\mu$ g de RNA total de tecido foliar da **cultivar sensível (SP90-1638)** de cana-de-açúcar submetida à supressão de rega.



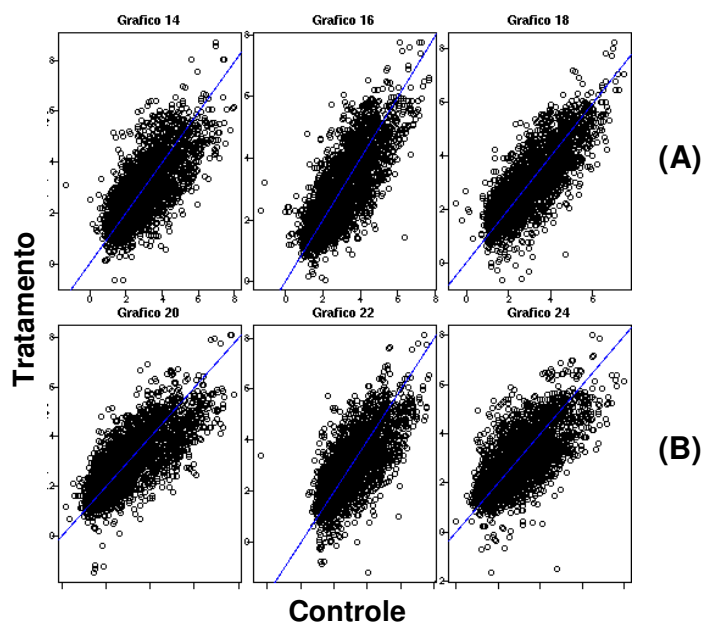
**Figura 4.** Histograma das freqüências relativas de todos os dados após normalização pelo método vsn, indicando que se aproximam de uma distribuição normal.



**Figura 5.** Diagrama de caixas (boxplots) de todos os dados normalizados das cultivares de cana-de-açúcar tolerante (SP83-2847) e sensível (SP90-1638), respectivamente.



**Figura 6.** Gráficos da dispersão conjunta dos dados dos níveis de expressão dos clones ESTs na **cultivar tolerante** submetida a supressão de rega versus os níveis de expressão apresentado pelo controle. No eixo horizontal temos a intensidade de expressão dos clones ESTs obtidas na situação controle. No eixo vertical temos a intensidade de expressão dos clones ESTs nos tratamentos por supressão de rega (déficit hídrico). **(A)** Três repetições independentes no ponto de coleta T1. **(B)** Três repetições independentes no ponto de coleta T2.

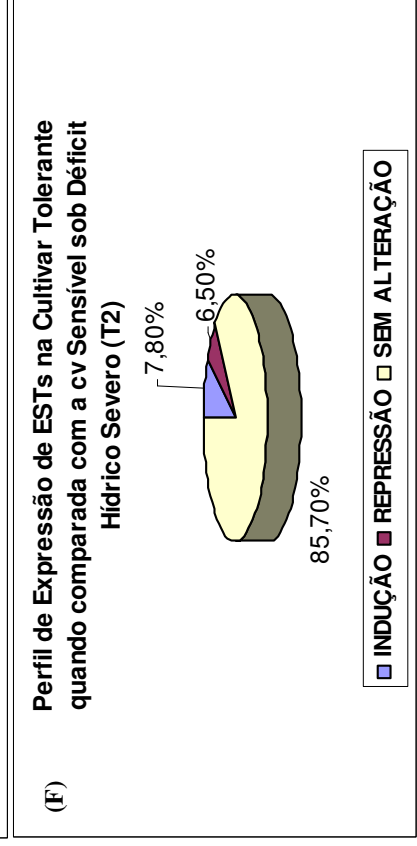
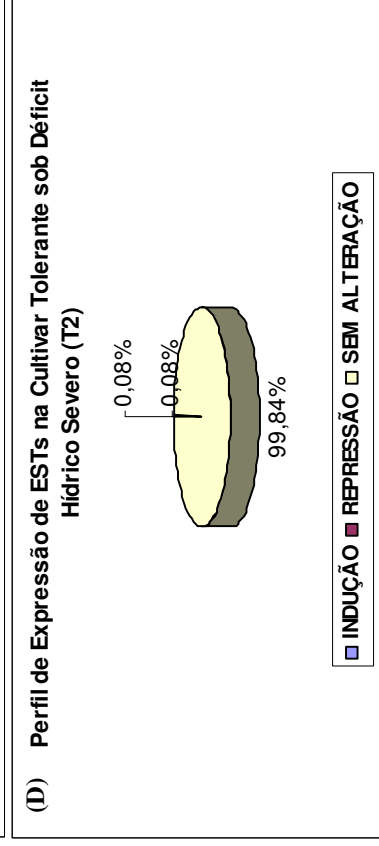
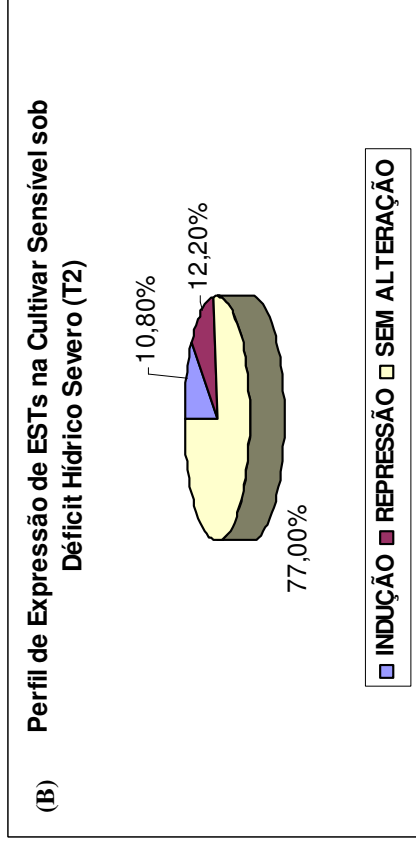
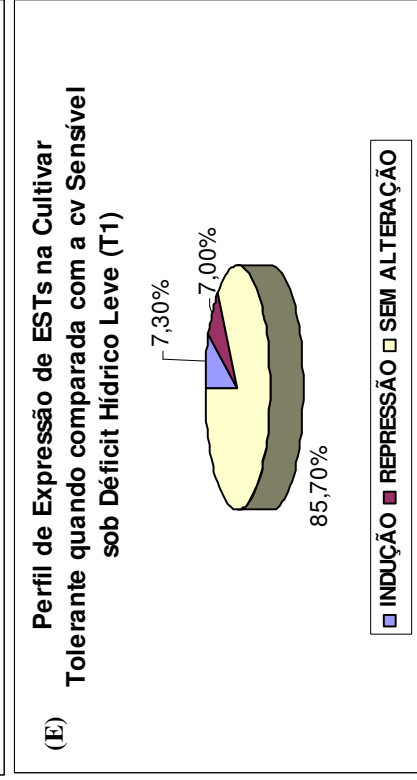
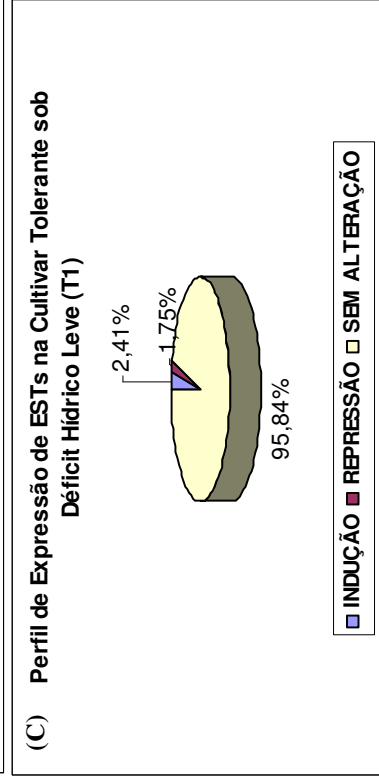
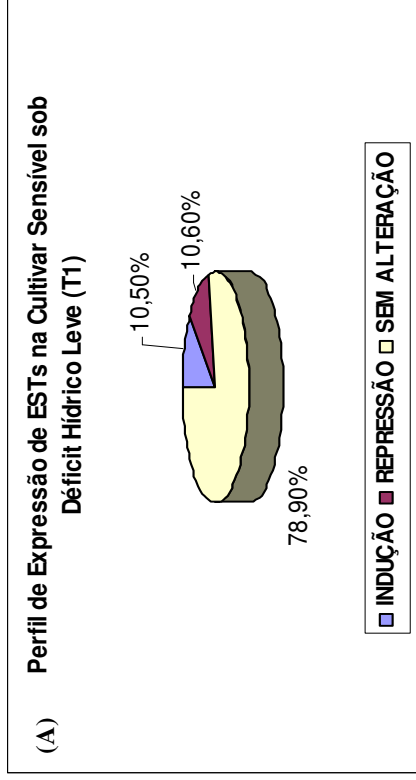


**Figura 7.** Gráficos da dispersão conjunta dos dados dos níveis de expressão dos clones ESTs na **cultivar sensível** submetida a supressão de rega versus os níveis de expressão apresentado pelo controle. No eixo horizontal temos a intensidade de expressão dos clones ESTs obtidas na situação controle. No eixo vertical temos a intensidade de expressão dos clones ESTs nos tratamentos por supressão de rega (déficit hídrico). **(A)** Três repetições independentes no ponto de coleta T1. **(B)** Três repetições independentes no ponto de coleta T2.

Na **figura 4** é possível observar que os dados apresentaram-se dentro de uma distribuição normal, sendo então aplicadas às análises estatísticas para a interpretação dos resultados. No presente trabalho, dois tipos de análises estatísticas foram realizados: uma a partir do perfil de expressão de cada cultivar comparando os dados das plantas sob estresse com os das plantas-controle e outra a partir do perfil de expressão da cultivar tolerante através de análise estatística comparativa entre as duas cultivares. Após a realização destas análises, foi considerado um gene (clone EST) diferencialmente expresso, quando seu p-value foi menor que 5% e o B-estatístico maior do que zero.

A partir das análises estatísticas, foi possível observar que, em ambas as cultivares, a maioria dos genes não apresentou alteração nos valores de expressão gênica (**Figura 8**). Entretanto, a cultivar sensível mostrou indução e repressão de aproximadamente 21 e 23% dos genes, respectivamente, nos dois períodos em estudo (**Figura 8A-B**), ao passo que, na cultivar tolerante, estes valores foram de aproximadamente 2,5 e 2,0%, ou seja, um menor número de genes sofreu indução e repressão, durante os mesmos períodos (**Figura 8C-D**). Por meio da análise estatística comparativa pode-se observar que os genes diferencialmente expressos entre as duas cultivares, nos dois períodos de estresse, perfazem uma indução e repressão de aproximadamente 15 e 13,5%, respectivamente (**Figura 8E-F**).





**Figura 8.** Perfil de expressão de 1.202 clones ESTs analisados em duas cultivares de cana-de-açúcar, SP83-2847 (cv tolerante) e SP90-1638 (cv sensível), submetidas a dois períodos de déficit hídrico: leve (T1) e severo (T2).

## 5.1 ESTs Diferencialmente Expressas em Cana-de-Açúcar

Através da técnica de macroarranjos de cDNA, foi possível observar dentre as ESTs diferencialmente expressas nas duas cultivares de cana-de-açúcar, ESTs similares às enzimas envolvidas nas respostas de osmoproteção incluindo as de biossíntese de prolina, glicina-betaína, trealose, hidroxiprolina e GABA; às enzimas de vias biossintéticas de hormônios vegetais relacionados as respostas ao estresse, tais como ácido jasmônico (JA), ácido abscísico (ABA) e auxina (AIA), bem como similares às enzimas antioxidantes, de síntese de fenilpropanóides entre outras (**Tabela II**). As ESTs que apresentaram expressão diferencial com significado estatístico, nas cultivares tolerante e sensível submetidas ao déficit hídrico, podem ser observadas nas **tabelas III e IV**, respectivamente.

Cheong e colaboradores (2002) estudando a expressão gênica diferencial em *Arabidopsis* submetida a tratamento por ferimento, observaram que genes relacionados à resposta a outros tipos de estresse, tal como o causado pela seca, foram responsivos ao tratamento por ferimento. Os autores mencionam que estudos têm mostrado que alguns genes são induzidos pelo estresse osmótico e pelo tratamento por ferimento, sugerindo possíveis interações entre as respostas ao ferimento e aos estresses abióticos. Raymond e colaboradores (2000) estudando em *Arabidopsis* a expressão gênica diferencial em resposta ao ferimento e a alimentação de insetos, perceberam que alguns genes induzidos pelo ferimento também são induzidos pela desidratação.

No presente trabalho, realizado em cana-de-açúcar, encontrou-se genes com expressão diferencial, os quais, segundo Cheong e colaboradores (2002), também se apresentaram como diferencialmente expressos em *Arabidopsis*, tais como ESTs similares as enzimas catalase, trealose-6P sintase, trealose-6P fosfatase, cinamil álcool desidrogenase,  $\Delta$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase, lipoxigenase, ácido 12-oxo-fitodienólico redutase, antranilato sintase, triptofano sintase, UDP-glicose-4-epimerase (**Tabela II**). Ademais, Rabbani e colaboradores (2003) avaliaram o perfil de expressão gênica de arroz submetido a diferentes tratamentos de estresse, tais como frio, seca, elevada salinidade, aplicação de ABA e observaram a indução de

genes, os quais também foram induzidos no presente estudo, como, por exemplo, da enzima piruvato desidrogenase quinase e fosfoglicerato quinase, bem como de alguns outros genes encontrados tanto em cana-de-açúcar como em *Arabidopsis* no trabalho de Cheong e colaboradores (2002). Rabbani e colaboradores (2003) ao compararem os genes induzidos em arroz pelos diferentes tratamentos de estresse com àqueles relatados em *Arabidopsis* observaram que muitos deles são comuns entre estas espécies; o que segundo eles poderia ser um indicativo de que há mecanismos moleculares similares de respostas e de tolerância ao estresse entre dicotiledôneas e monocotiledôneas. Os resultados obtidos em cana-de-açúcar estão de acordo com a observação feita por estes autores, confirmando a semelhança entre as respostas ao estresses nestes dois grupos de angiospermas.

**Tabela II. Clones ESTs Diferencialmente Expressos em Cana-de-açúcar sob Déficit Hídrico**

Identificação Clone	N° Acesso	E Value	Descrição	Organismo
<b>Biossíntese de Prolina</b>				
LR2001F05.g	<a href="#">gij53749354 gb AAU90213.1 </a>	3e-58	Putative P5CS	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
LR1121C10.g	<a href="#">gij66356280 gb AA45745.1 </a>	6e-18	P5CR	[Zea mays]
FL4045H06.g	<a href="#">gij55296125 dbj BAD67843.1 </a>	8e-86	Putative prolyl aminopeptidase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de GABA</b>				
SB1117F02.g	<a href="#">gij50540685 gb AAT77842.1 </a>	5e-77	Putative GAD isozyme	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Hidroxiprolina</b>				
RT2083F04.g	<a href="#">gij509334891 ref XP_476973.1 </a>	2e-94	PH $\alpha$ -1 subunit precursor-like protein	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Glicina Betaina</b>				
HR1030B02.g	<a href="#">gij33300598 emb CAE17671.1 </a>	1e-96	Choline monoxygenase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
FL3025H03.g	<a href="#">gij50086699 gb AAT70230.1 </a>	3e-100	BADH	[Zea mays]
<b>Biossíntese de Trealose</b>				
ST1048E05.g	<a href="#">gij50932377 ref XP_475716.1 </a>	6e-123	Putative TPS	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
SB1123A10.g	<a href="#">gij34909526 ref NP_916110.1 </a>	2e-109	Putative TPS homolog	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AD1039F02.g	<a href="#">gij50945643 ref XP_482349.1 </a>	1e-109	Putative TPP	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Pinitol</b>				
AM2093A01.g	<a href="#">gij11762100 gb AAG40328.1 </a>	1e-101	myo-inositol 1-P synthase	[Zea mays]
<b>Sistema de Defesa Antioxidante</b>				
FL3012G11.g	<a href="#">gij134613 sp P11428 SODC_MAIZE</a>	6e-66	SOD[Cu-Zn] 2	[Zea mays]
RT3078G02.g	<a href="#">gij58737157 dbj BAD89495.1 </a>	7e-126	Chloroplastic iron-SOD	[Zea mays]
AD1048F08.g	<a href="#">gij15080682 dbj BAB62533.1 </a>	7e-75	Peroxisome type APX	[Hordeum vulgare subsp. vulgare]
SD1038C01.g	<a href="#">gij600116 emb CAA84406.1 </a>	9e-93	Cytosolic APX	[Zea mays]
FL1072A07.g	<a href="#">gij15626361 emb CAC69935.1 </a>	7e-113	MDHAR	[Hordeum vulgare subsp. vulgare]
RZ3040E04.g	<a href="#">gij28192421 gb AAL71854.1 </a>	6e-59	DHAR	[Triticum aestivum]
RT1061B02.g	<a href="#">gij311239 emb CAA42720.1 </a>	8e-128	Catalase-1	[Zea mays]
<b>Catabolismo de Purinas</b>				
FL1144H01.g	<a href="#">gij50838979 gb AAT81740.1 </a>	1e-120	XDH, putative	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
RT1020E04.g	<a href="#">gij34908558 ref NP_915626.1 </a>	1e-101	Putative uricase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
RT2050G12.g	<a href="#">gij34908558 ref NP_915626.1 </a>	2e-103	Putative uricase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

**Tabela II. continuação**

Identificação Clone	N° Acesso	E Value	Descrição	Organismo
<b>Biossíntese de Carotenóides e ABA</b>				
FL1122D09.g	<a href="#">gij50901836 ref XP_463351.1 </a>	8e-58	Putative lycopene $\epsilon$ -cyclase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
FL3087G08.g	<a href="#">gij56681445 gb AAW21317.1 </a>	2e-58	NCED 1	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Triptofano e AIA</b>				
RT3064H04.g	<a href="#">gij50919517 ref XP_470150.1 </a>	7e-84	AnS $\alpha$ .1 subunit	[Oryza sativa]
AM2075F11.g	<a href="#">gij50937159 ref XP_478107.1 </a>	7e-124	Putative PAT	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
SB1012G05.g	<a href="#">gij50944103 ref XP_481579.1 </a>	2e-66	Putative IGP synthase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
CL6059F09.g	<a href="#">gij18481702 gb AAL73524.1 </a>	2e-69	Trp synthase $\beta$ -subunit	[Sorghum bicolor]
SB1001C12.g	<a href="#">gij50910980 ref XP_466923.1 </a>	7e-68	Putative nitrilase 1	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
ST3126G01.g	<a href="#">gij50940989 ref XP_480022.1 </a>	4e-84	Putative TrpDC	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Etileno</b>				
ST1014H12.g	<a href="#">gij29027806 dbj BAC65881.1 </a>	8e-116	Putative AdoMet synthetase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Di- e Poliaminas e Catabolismo de Aminas Biogênicas</b>				
FL8014D03.g	<a href="#">gij50916205 ref XP_468563.1 </a>	1e-83	Putative LDC-like protein	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
FL5022E11.g	<a href="#">gij6468656 emb CAB61629.1 </a>	2e-95	Spermidine synthase 1	[Oryza sativa]
SB1139F11.g	<a href="#">gij54291223 dbj BAD61919.1 </a>	1e-58	Putative diamine oxidase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
SB1143H12.g	<a href="#">gij9844871 emb CAC04002.1 </a>	4e-97	Polyamine oxidase	[Zea mays]
SD1048H01.g	<a href="#">gij1532073 emb CAA69075.1 </a>	2e-69	SAMDC	[Zea mays]
LV1008E05.g	<a href="#">gij5230728 gb AAD40979.1 </a>	2e-105	Peroxisomal copper-containing amine oxidase (Methylamine oxidase)	[Glycine max]
<b>Biossíntese de Jasmonato</b>				
ST3111F12.g	<a href="#">gij25809278 emb CAD45187.1 </a>	2e-109	Lipoxygenase 2	[Hordeum vulgare subsp. vulgare]
RT2021B04.g	<a href="#">gij39980760 gb AAR33049.1 </a>	4e-71	Allene oxide cyclase	[Zea mays]
RT1005D06.g	<a href="#">gij63021731 gb AAAY26527.1 </a>	2e-99	OPR	[Zea mays]
SD1024F06.g	<a href="#">gij50915896 ref XP_468412.1 </a>	4e-86	Putative KAT	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Fenilpropanóides</b>				
FL3060H09.g	<a href="#">gij29367609 gb AAO72666.1 </a>	1e-86	PAL	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
HR1008H10.g	<a href="#">gij17467274 gb AAL40137.1 </a>	1e-75	PAL	[Zea mays]
RT2032C05.g	<a href="#">gij50252451 dbj BAD28605.1 </a>	3e-88	Putative CAD	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
FL1C08B02.g	<a href="#">gij50508642 dbj BAD31128.1 </a>	1e-92	Putative 4CL 1	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
SB1C07G01.g	<a href="#">gij34398680 gb AAQ67347.1 </a>	5e-53	COMT	[Saccharum hybrid cultivar]

**Tabela II. continuação**

Identificação Clone	N° Acesso	E Value	Descrição	Organismo
<b>Biossíntese de Isoprenóides</b>				
FL3016F01.g	<a href="#">gij1154889 emb CAA92821.1 </a>	3e-73	HMGR	[Oryza sativa (indica cultivar-group)]
<b>β-Oxidação</b>				
SD1024F06.g	<a href="#">gij50915896 ref XP_468412.1 </a>	4e-86	Putative KAT	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Rota Oxidativa das Pentoses Fosfato</b>				
RZ1024A11.g	<a href="#">gij33304517 gb AAQ02671.1 </a>	3e-94	Putative plastidic G6PDH	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
LR1074D04.g	<a href="#">gij50948225 ref XP_483640.1 </a>	1e-59	Putative 6-phosphogluconolactonase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AD1C09B11.g	<a href="#">gij38426301 gb AAP33506.2 </a>	5e-82	Cytosolic 6-phosphogluconate DH	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
FL1049D08.g	<a href="#">gij50919867 ref XP_470294.1 </a>	4e-65	Pentose-P epimerase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
FL4020E07.g	<a href="#">gij28948384 pdb 1ITZ C</a>	7e-106	Chain C, Maize Transketolase In Complex With Tpp	[Zea mays]
<b>Glicólise</b>				
FL5011A10.g	<a href="#">gij40217607 db BAD05180.1 </a>	3e-74	Cell wall invertase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
RT1018H09.g	<a href="#">gij4105125 gb AAD02264.1 </a>	2e-89	Cell wall invertase; β-fructosidase; Incw4	[Zea mays]
LR1076F08.g	<a href="#">gij3136313 gb AAC16655.1 </a>	4e-67	Soluble acid invertase	[Saccharum officinarum]
ST3135A03.g	<a href="#">gij31872118 gb AAP59436.1 </a>	9e-69	Soluble acid invertase	[Saccharum hybrid cultivar]
AM2132E11.g	<a href="#">gij34391404 gb AAM68126.1 </a>	6e-141	Sucrose synthase	[Saccharum officinarum]
AM1049C01.g	<a href="#">gij37729658 gb AAO48422.1 </a>	1e-72	UDP-glucose pyrophosphorylase	[Bambusa oldhamii]
RT1049G10.g	<a href="#">gij57863790 gb AAS86398.2 </a>	1e-95	Putative hexokinase 1	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AM1006F12.g	<a href="#">gij50946139 ref XP_482597.1 </a>	3e-117	Putative PFK-PPi	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AD1C08A07.g	<a href="#">gij2494075 sp Q43272 GAPN_MAIZE</a>	3e-92	Non-phosphorylating glyceraldehyde 3-P DH [NADP+]	[Zea mays]
AD1036C07.g	<a href="#">gij52076544 db BAD45421.1 </a>	1e-87	Putative cytosolic phosphoglycerate kinase 1	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
LB2065F12.g	<a href="#">gij551288 emb CAA83914.1 </a>	7e-85	Phosphoglycerate mutase	[Zea mays]
RT1068C11.g	<a href="#">gij15221107 ref INP_177543.1 </a>	2e-115	Enolase	[Arabidopsis thaliana]
<b>Ciclo do Ácido Cítrico (Ciclo de Krebs)</b>				
CL3001C03.g	<a href="#">gij77551304 gb ABA94101.1 </a>	6e-106	Citrate synthase, eukaryotic	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AD1010B09.g	<a href="#">gij50941891 ref XP_480473.1 </a>	6e-127	Putative Aconitase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
RZ3109C06.g	<a href="#">gij50940213 ref XP_479634.1 </a>	2e-64	Putative α-Ketoglutarate dehydrogenase E1 subunit	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

**Tabela II. continuação**

Identificação	Clone	N° Acesso	E Value	Descrição	Organismo
HR1088C07.g		<a href="#">gi 50910635 ref XP_466806.1 </a>	2e-95	Putative Succinyl CoA-synthetase (GDP-forming) β-chain, mitochondrial precursor	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
RZ1022H10.g		<a href="#">gi 152226618 ref NP_182273.1 </a>	6e-71	Fumarate 1	[Arabidopsis thaliana]
SD2068B01.g		<a href="#">gi 3695005 gb AAC63962.1 </a>	1e-56	PDK isoform 2	[Zea mays]
<b>Biossíntese e Degradação de Amido</b>					
LB2053D11.g		<a href="#">gi 62732953 gb AAX95072.1 </a>	4e-110	Fructose-bisphosphate aldolase class-I	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AD1068G10.g		<a href="#">gi 13892040 gb AAK39640.1 </a>	1e-100	ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	[Zea mays]
FL5075A01.g		<a href="#">gi 3057120 gb AAC14014.1 </a>	2e-95	Starch synthase DULL1	[Zea mays]
RT2096B04.g		<a href="#">gi 18139611 gb AAL58572.1 </a>	3e-75	Granule binding starch synthase II precursor	[Oryza sativa]
RT2086C11.g		<a href="#">gi 55297315 dbj BAD69144.1 </a>	4e-120	Putative Starch-branching enzyme	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AM2053H08.g		<a href="#">gi 5689138 dbj BAA82828.1 </a>	2e-136	Starch branching enzyme rbe4	[Oryza sativa]
SB1052E09.g		<a href="#">gi 34908348 ref NP_915521.1 </a>	2e-67	Starch phosphorylase H isozyme	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Reações do Ciclo de Calvin e Biossíntese de Sacarose</b>					
SB1012G07.g		<a href="#">gi 169842 gb AAA33922.1 </a>	2e-82	RuBisCO small subunit	[Saccharum hybrid cultivar H32-8560]
AM1018H08.g		<a href="#">gi 168647 gb AAB81110.1 </a>	2e-96	Triosephosphate isomerase 1	[Zea mays]
CL3120C03.g		<a href="#">gi 295850 emb CAA31366.1 </a>	2e-108	Fructose bisphosphate aldolase	[Zea mays]
SB1091A09.g		<a href="#">gi 1346073 sp P49105 G6PI_MAIZE </a>	1e-69	Glucose-6-P isomerase, cytosolic	[Zea mays]
SB1123E03.g		<a href="#">gi 50900276 ref XP_450926.1 </a>	7e-73	Putative glucose-6-P isomerase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AM1049C01.g		<a href="#">gi 37729658 gb AAO48422.1 </a>	1e-72	UDP-glucose pyrophosphorylase	[Bambusa oldhamii]
<b>Reações do Ciclo Fotossintético C<sub>4</sub> do Carbono</b>					
AM2061F10.g		<a href="#">gi 169844 gb AAC33164.1 </a>	2e-82	PEP carboxylase	[Saccharum hybrid cultivar H32-8560]
SD1044B02.g		<a href="#">gi 30526303 gb AAP32204.1 </a>	1e-94	NADP-dependent malic enzyme	[Sorghum bicolor]
CL6056D07.g		<a href="#">gi 55741099 gb AAV64237.1 </a>	2e-51	Putative alanine aminotransferase	[Zea mays]
RT2055G01.g		<a href="#">gi 50916819 ref XP_468806.1 </a>	2e-117	Cytosolic PPK	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Reações do Ciclo Oxidativo Fotossintético C<sub>2</sub> do Carbono</b>					
SB1012G07.g		<a href="#">gi 169842 gb AAA33922.1 </a>	2e-82	RuBisCO small subunit	[Saccharum hybrid cultivar H32-8560]
RT1013H04.g		<a href="#">gi 50939277 ref XP_479166.1 </a>	6e-95	Putative glycolate oxidase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

**Tabela II. continuação**

Identificação	Clone	Nº Acesso	E Value	Descrição	Organismo
HR1084D12.g		<a href="#">gij37536058</a> <a href="#"> ref INP_922331.1</a>	1e-52	Putative GDC subunit	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
RT1057C06.g		<a href="#">gij50904581</a> <a href="#"> ref XP_463779.1</a>	4e-91	Putative hydroxypyruvate reductase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Ciclo do Glioxilato</b>					
CL6005D11.g		<a href="#">gij50937953</a> <a href="#"> ref XP_478504.1</a>	1e-103	Putative isocitrate lyase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
CL7C01B02.g		<a href="#">gij1346487</a> <a href="#"> sp P49081 MASY_MAIZE</a>	8e-84	Malate synthase, glyoxysomal	[Zea mays]
<b>Assimilação do Amônio</b>					
HR1018B10.g		<a href="#">gij50919147</a> <a href="#"> ref XP_469970.1</a>	2e-89	Glutamate dehydrogenase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AD1056D04.g		<a href="#">gij34911932</a> <a href="#"> ref INP_917313.1</a>	3e-98	NADP-specific isocitrate dehydrogenase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Modificação da Parede Celular</b>					
CL6055H11.g		<a href="#">gij32130594</a> <a href="#"> gb AAP68981.1</a>	1e-104	UDP-glucose-4-epimerase	[Zea mays]

**P5CS**,  $\Delta$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase; P5CR,  $\Delta$ -pirrolina-5-carboxilato reductase; GABA, ácido  $\gamma$ -aminobutírico; GAD, glutamato descarboxilase; PH, prolil hidroxilase; BADH, betaína aldeído desidrogenase; TPS, trealose-6-fosfato sintase; TPP, trealose-6-fosfato fosfatase; SOD, superóxido desmutase; APX, ascorbato peroxidase; MDHAR, monodeidroascorbato reductase; DHAR, deidroascorbato reductase; XDH, xantina desidrogenase; ABA, ácido abscísico; NCED, 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase; AIA, auxina; AnS, Antranilato sintase; PAT, fosforibosilatrnilato transferase; IGP sintase, indol-3-glicerol fosfato sintase; Trp sintase, tryptophan synthase; TrpDC, triptofano descarboxilase; LDC, lisina descarboxilase; SAMDC ou AdoMetDC, S-adenosilmetionina descarboxilase; OPR, ácido 12-oxo-fitodienólico reductase; KAT, 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase; PAL, fenilalanina amônia liase; CAD, cinamil álcool desidrogenase; 4CL, 4-coumarato-CoA ligase; COMT, ácido caféico 3-O-metiltransferase; HMGR, hidroximetilglutaril-CoA reductase; G6PDH, glicose-6-fosfato desidrogenase; PFK-PPI, fosfofrutoquinase dependente de pirofosfato; PDK, piruvato desidrogenase quinase; RuBisCO, Ribulose bifosfato carboxilase oxigenase; PEP carboxilase, fosfoenolpiruvato descarboxilase; PPDK, piruvato-ortofosfato diquinase; GDC, glicina descarboxilase.



**Tabela II. Clones ESTs Diferencialmente Expressos em Cana-de-açúcar sob Déficit Hídrico**

Identificação Clone	N° Acesso	E Value	Descrição	Organismo
<b>Biossíntese de Prolina</b>				
LR2001F05.g	<a href="#">gij53749354 gb AAU90213.1 </a>	3e-58	Putative P5CS	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
LR1121C10.g	<a href="#">gij66356280 gb AA45745.1 </a>	6e-18	P5CR	[Zea mays]
FL4045H06.g	<a href="#">gij55296125 dbj BAD67843.1 </a>	8e-86	Putative prolyl aminopeptidase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de GABA</b>				
SB1117F02.g	<a href="#">gij50540685 gb AAT77842.1 </a>	5e-77	Putative GAD isozyme	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Hidroxiprolina</b>				
RT2083F04.g	<a href="#">gij509334891 ref XP_476973.1 </a>	2e-94	PH $\alpha$ -1 subunit precursor-like protein	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Glicina Betaina</b>				
HR1030B02.g	<a href="#">gij33300598 emb CAE17671.1 </a>	1e-96	Choline monoxygenase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
FL3025H03.g	<a href="#">gij50086699 gb AAT70230.1 </a>	3e-100	BADH	[Zea mays]
<b>Biossíntese de Trealose</b>				
ST1048E05.g	<a href="#">gij50932377 ref XP_475716.1 </a>	6e-123	Putative TPS	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
SB1123A10.g	<a href="#">gij34909526 ref NP_916110.1 </a>	2e-109	Putative TPS homolog	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AD1039F02.g	<a href="#">gij50945643 ref XP_482349.1 </a>	1e-109	Putative TPP	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Pinitol</b>				
AM2093A01.g	<a href="#">gij11762100 gb AAG40328.1 </a>	1e-101	myo-inositol 1-P synthase	[Zea mays]
<b>Sistema de Defesa Antioxidante</b>				
FL3012G11.g	<a href="#">gij134613 sp P11428 SODC_MAIZE</a>	6e-66	SOD[Cu-Zn] 2	[Zea mays]
RT3078G02.g	<a href="#">gij58737157 dbj BAD89495.1 </a>	7e-126	Chloroplastic iron-SOD	[Zea mays]
AD1048F08.g	<a href="#">gij15080682 dbj BAB62533.1 </a>	7e-75	Peroxisome type APX	[Hordeum vulgare subsp. vulgare]
SD1038C01.g	<a href="#">gij600116 emb CAA84406.1 </a>	9e-93	Cytosolic APX	[Zea mays]
FL1072A07.g	<a href="#">gij15626361 emb CAC69935.1 </a>	7e-113	MDHAR	[Hordeum vulgare subsp. vulgare]
RZ3040E04.g	<a href="#">gij28192421 gb AAL71854.1 </a>	6e-59	DHAR	[Triticum aestivum]
RT1061B02.g	<a href="#">gij311239 emb CAA42720.1 </a>	8e-128	Catalase-1	[Zea mays]
<b>Catabolismo de Purinas</b>				
FL1144H01.g	<a href="#">gij50838979 gb AAT81740.1 </a>	1e-120	XDH, putative	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
RT1020E04.g	<a href="#">gij34908558 ref NP_915626.1 </a>	1e-101	Putative uricase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
RT2050G12.g	<a href="#">gij34908558 ref NP_915626.1 </a>	2e-103	Putative uricase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

**Tabela II. continuação**

Identificação Clone	N° Acesso	E Value	Descrição	Organismo
<b>Biossíntese de Carotenóides e ABA</b>				
FL1122D09.g	<a href="#">gij50901836 ref XP_463351.1 </a>	8e-58	Putative lycopene $\epsilon$ -cyclase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
FL3087G08.g	<a href="#">gij56681445 gb AAW21317.1 </a>	2e-58	NCED 1	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Triptofano e AIA</b>				
RT3064H04.g	<a href="#">gij50919517 ref XP_470150.1 </a>	7e-84	AnS $\alpha$ .1 subunit	[Oryza sativa]
AM2075F11.g	<a href="#">gij50937159 ref XP_478107.1 </a>	7e-124	Putative PAT	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
SB1012G05.g	<a href="#">gij50944103 ref XP_481579.1 </a>	2e-66	Putative IGP synthase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
CL6059F09.g	<a href="#">gij18481702 gb AAL73524.1 </a>	2e-69	Trp synthase $\beta$ -subunit	[Sorghum bicolor]
SB1001C12.g	<a href="#">gij50910980 ref XP_466923.1 </a>	7e-68	Putative nitrilase 1	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
ST3126G01.g	<a href="#">gij50940989 ref XP_480022.1 </a>	4e-84	Putative TrpDC	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Etileno</b>				
ST1014H12.g	<a href="#">gij29027806 dbj BAC65881.1 </a>	8e-116	Putative AdoMet synthetase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Di- e Poliaminas e Catabolismo de Aminas Biogênicas</b>				
FL8014D03.g	<a href="#">gij50916205 ref XP_468563.1 </a>	1e-83	Putative LDC-like protein	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
FL5022E11.g	<a href="#">gij6468656 emb CAB61629.1 </a>	2e-95	Spermidine synthase 1	[Oryza sativa]
SB1139F11.g	<a href="#">gij54291223 dbj BAD61919.1 </a>	1e-58	Putative diamine oxidase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
SB1143H12.g	<a href="#">gij9844871 emb CAC04002.1 </a>	4e-97	Polyamine oxidase	[Zea mays]
SD1048H01.g	<a href="#">gij1532073 emb CAA69075.1 </a>	2e-69	SAMDC	[Zea mays]
LV1008E05.g	<a href="#">gij5230728 gb AAD40979.1 </a>	2e-105	Peroxisomal copper-containing amine oxidase (Methylamine oxidase)	[Glycine max]
<b>Biossíntese de Jasmonato</b>				
ST3111F12.g	<a href="#">gij25809278 emb CAD45187.1 </a>	2e-109	Lipoxygenase 2	[Hordeum vulgare subsp. vulgare]
RT2021B04.g	<a href="#">gij39980760 gb AAR33049.1 </a>	4e-71	Allene oxide cyclase	[Zea mays]
RT1005D06.g	<a href="#">gij63021731 gb AAAY26527.1 </a>	2e-99	OPR	[Zea mays]
SD1024F06.g	<a href="#">gij50915896 ref XP_468412.1 </a>	4e-86	Putative KAT	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Biossíntese de Fenilpropanóides</b>				
FL3060H09.g	<a href="#">gij29367609 gb AAO72666.1 </a>	1e-86	PAL	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
HR1008H10.g	<a href="#">gij17467274 gb AAL40137.1 </a>	1e-75	PAL	[Zea mays]
RT2032C05.g	<a href="#">gij50252451 dbj BAD28605.1 </a>	3e-88	Putative CAD	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
FL1C08B02.g	<a href="#">gij50508642 dbj BAD31128.1 </a>	1e-92	Putative 4CL 1	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
SB1C07G01.g	<a href="#">gij34398680 gb AAQ67347.1 </a>	5e-53	COMT	[Saccharum hybrid cultivar]

**Tabela II. continuação**

Identificação Clone	N° Acesso	E Value	Descrição	Organismo
<b>Biossíntese de Isoprenóides</b>				
FL3016F01.g	<a href="#">gij1154889 emb CAA92821.1 </a>	3e-73	HMGR	[Oryza sativa (indica cultivar-group)]
<b>β-Oxidação</b>				
SD1024F06.g	<a href="#">gij50915896 ref XP_468412.1 </a>	4e-86	Putative KAT	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Rota Oxidativa das Pentoses Fosfato</b>				
RZ1024A11.g	<a href="#">gij33304517 gb AAQ02671.1 </a>	3e-94	Putative plastidic G6PDH	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
LR1074D04.g	<a href="#">gij50948225 ref XP_483640.1 </a>	1e-59	Putative 6-phosphogluconolactonase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AD1C09B11.g	<a href="#">gij38426301 gb AAP33506.2 </a>	5e-82	Cytosolic 6-phosphogluconate DH	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
FL1049D08.g	<a href="#">gij50919867 ref XP_470294.1 </a>	4e-65	Pentose-P epimerase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
FL4020E07.g	<a href="#">gij28948384 pdb 1ITZ C</a>	7e-106	Chain C, Maize Transketolase In Complex With Tpp	[Zea mays]
<b>Glicólise</b>				
FL5011A10.g	<a href="#">gij40217607 db BAD05180.1 </a>	3e-74	Cell wall invertase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
RT1018H09.g	<a href="#">gij4105125 gb AAD02264.1 </a>	2e-89	Cell wall invertase; β-fructosidase; Incw4	[Zea mays]
LR1076F08.g	<a href="#">gij3136313 gb AAC16655.1 </a>	4e-67	Soluble acid invertase	[Saccharum officinarum]
ST3135A03.g	<a href="#">gij31872118 gb AAP59436.1 </a>	9e-69	Soluble acid invertase	[Saccharum hybrid cultivar]
AM2132E11.g	<a href="#">gij34391404 gb AAM68126.1 </a>	6e-141	Sucrose synthase	[Saccharum officinarum]
AM1049C01.g	<a href="#">gij37729658 gb AAO48422.1 </a>	1e-72	UDP-glucose pyrophosphorylase	[Bambusa oldhamii]
RT1049G10.g	<a href="#">gij57863790 gb AAS86398.2 </a>	1e-95	Putative hexokinase 1	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AM1006F12.g	<a href="#">gij50946139 ref XP_482597.1 </a>	3e-117	Putative PFK-PPi	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AD1C08A07.g	<a href="#">gij2494075 sp Q43272 GAPN_MAIZE</a>	3e-92	Non-phosphorylating glyceraldehyde 3-P DH [NADP+]	[Zea mays]
AD1036C07.g	<a href="#">gij52076544 db BAD45421.1 </a>	1e-87	Putative cytosolic phosphoglycerate kinase 1	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
LB2065F12.g	<a href="#">gij551288 emb CAA83914.1 </a>	7e-85	Phosphoglycerate mutase	[Zea mays]
RT1068C11.g	<a href="#">gij15221107 ref NP_177543.1 </a>	2e-115	Enolase	[Arabidopsis thaliana]
<b>Ciclo do Ácido Cítrico (Ciclo de Krebs)</b>				
CL3001C03.g	<a href="#">gij77551304 gb ABA94101.1 </a>	6e-106	Citrate synthase, eukaryotic	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AD1010B09.g	<a href="#">gij50941891 ref XP_480473.1 </a>	6e-127	Putative Aconitase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
RZ3109C06.g	<a href="#">gij50940213 ref XP_479634.1 </a>	2e-64	Putative α-Ketoglutarate dehydrogenase E1 subunit	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

**Tabela II. continuação**

Identificação	Clone	N° Acesso	E Value	Descrição	Organismo
HR1088C07.g		<a href="#">gij50910635 ref XP_466806.1 </a>	2e-95	Putative Succinyl CoA-synthetase (GDP-forming) β-chain, mitochondrial precursor	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
RZ1022H10.g		<a href="#">gij15226618 ref NP_182273.1 </a>	6e-71	Fumarate 1	[Arabidopsis thaliana]
SD2068B01.g		<a href="#">gij3695005 gb AAC63962.1 </a>	1e-56	PDK isoform 2	[Zea mays]
<b>Biossíntese e Degradação de Amido</b>					
LB2053D11.g		<a href="#">gij62732953 gb AAX95072.1 </a>	4e-110	Fructose-bisphosphate aldolase class-I	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AD1068G10.g		<a href="#">gij13892040 gb AAK39640.1 </a>	1e-100	ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	[Zea mays]
FL5075A01.g		<a href="#">gij3057120 gb AAC14014.1 </a>	2e-95	Starch synthase DULL1	[Zea mays]
RT2096B04.g		<a href="#">gij18139611 gb AAL58572.1 </a>	3e-75	Granule binding starch synthase II precursor	[Oryza sativa]
RT2086C11.g		<a href="#">gij55297315 dbj BAD69144.1 </a>	4e-120	Putative Starch-branching enzyme	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AM2053H08.g		<a href="#">gij5689138 dbj BAA82828.1 </a>	2e-136	Starch branching enzyme rbe4	[Oryza sativa]
SB1052E09.g		<a href="#">gij34908348 ref NP_915521.1 </a>	2e-67	Starch phosphorylase H isozyme	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Reações do Ciclo de Calvin e Biossíntese de Sacarose</b>					
SB1012G07.g		<a href="#">gij169842 gb AAA33922.1 </a>	2e-82	RuBisCO small subunit	[Saccharum hybrid cultivar H32-8560]
AM1018H08.g		<a href="#">gij168647 gb AAB81110.1 </a>	2e-96	Triosephosphate isomerase 1	[Zea mays]
CL3120C03.g		<a href="#">gij295850 emb CAA31366.1 </a>	2e-108	Fructose bisphosphate aldolase	[Zea mays]
SB1091A09.g		<a href="#">gij1346073 sp P49105 G6P1_MAIZE </a>	1e-69	Glucose-6-P isomerase, cytosolic	[Zea mays]
SB1123E03.g		<a href="#">gij50900276 ref XP_450926.1 </a>	7e-73	Putative glucose-6-P isomerase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AM1049C01.g		<a href="#">gij37729658 gb AAO48422.1 </a>	1e-72	UDP-glucose pyrophosphorylase	[Bambusa oldhamii]
<b>Reações do Ciclo Fotossintético C<sub>4</sub> do Carbono</b>					
AM2061F10.g		<a href="#">gij169844 gb AAC33164.1 </a>	2e-82	PEP carboxylase	[Saccharum hybrid cultivar H32-8560]
SD1044B02.g		<a href="#">gij30526303 gb AAP32204.1 </a>	1e-94	NADP-dependent malic enzyme	[Sorghum bicolor]
CL6056D07.g		<a href="#">gij55741099 gb AAV64237.1 </a>	2e-51	Putative alanine aminotransferase	[Zea mays]
RT2055G01.g		<a href="#">gij50916819 ref XP_468806.1 </a>	2e-117	Cytosolic PPK	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Reações do Ciclo Oxidativo Fotossintético C<sub>2</sub> do Carbono</b>					
SB1012G07.g		<a href="#">gij169842 gb AAA33922.1 </a>	2e-82	RuBisCO small subunit	[Saccharum hybrid cultivar H32-8560]
RT1013H04.g		<a href="#">gij50939277 ref XP_479166.1 </a>	6e-95	Putative glycolate oxidase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

**Tabela II. continuação**

Identificação	Clone	Nº Acesso	E Value	Descrição	Organismo
HR1084D12.g		<a href="#">gi 37536058 ref NP_922331.1 </a>	1e-52	Putative GDC subunit	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
RT1057C06.g		<a href="#">gi 50904581 ref XP_463779.1 </a>	4e-91	Putative hydroxypyruvate reductase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Ciclo do Glioxilato</b>					
CL6005D11.g		<a href="#">gi 50937953 ref XP_478504.1 </a>	1e-103	Putative isocitrate lyase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
CL7C01B02.g		<a href="#">gi 1346487 sp P49081 MASY_MAIZE</a>	8e-84	Malate synthase, glyoxysomal	[Zea mays]
<b>Assimilação do Amônio</b>					
HR1018B10.g		<a href="#">gi 50919147 ref XP_469970.1 </a>	2e-89	Glutamate dehydrogenase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
AD1056D04.g		<a href="#">gi 34911932 ref NP_917313.1 </a>	3e-98	NADP-specific isocitrate dehydrogenase	[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<b>Modificação da Parede Celular</b>					
CL6055H11.g		<a href="#">gi 32130594 gb AAP68981.1 </a>	1e-104	UDP-glucose-4-epimerase	[Zea mays]

**P5CS**,  $\Delta$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase; **P5CR**,  $\Delta$ -pirrolina-5-carboxilato reductase; **GABA**, ácido  $\gamma$ -aminobutírico; **GAD**, glutamato descarboxilase; **PH**, prolil hidroxilase; **BADH**, betaína aldeído desidrogenase; **TPS**, trealose-6-fosfato sintase; **TPP**, trealose-6-fosfato sintase; **SOD**, superóxido desmutase; **APX**, ascorbato peroxidase; **MDHAR**, monodeidroascorbato reductase; **DHAR**, deidroascorbato reductase; **XDH**, xantina desidrogenase; **ABA**, ácido abscísico; **NCED**, 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase; **AIA**, auxina; **AnS**, Antranilato sintase; **PAT**, fosforibosilatrânilato transferase; **IGP** sintase, indol-3-glicerol fosfato sintase; **Trp** sintase, tryptophan synthase; **TrpDC**, triptofano descarboxilase; **LDC**, lisina descarboxilase; **SAMDC** ou **AdoMetDC**, S-adenosilmetionina descarboxilase; **OPR**, ácido 12-oxo-fitodienólico reductase; **KAT**, 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase; **PAL**, fenilalanina amônia liase; **CAD**, cinamil álcool desidrogenase; **4CL**, 4-coumarato-CoA ligase; **COMT**, ácido caféico 3-O-metiltransferase; **HMGR**, hidro ximetilglutaril-CoA reductase; **G6PDH**, glicose-6-fosfato desidrogenase; **PFK-PPi**, fosfofrutoquinase dependente de pirofosfato; **PDK**, piruvato desidrogenase quinase; **RuBisCO**, Ribulose bifosfato carboxilase oxigenase; **PEP** carboxilase, fosfoenolpiruvato descarboxilase; **PPDK**, piruvato-ortofosfato diquinase; **GDC**, glicina descarboxilase.

**Tabela III. Clones ESTs Diferencialmente Expressos na cv Tolerante ao Déficit Hídrico (SP83-2847)**

<b>Identificação Clone</b>	<b>E Value</b>	<b>Descrição</b>
<b>Indução T1</b>		
LR2001F05.g	3e-58	Putative P5CS
LR1121C10.g	6e-18	P5CR
SB1117F02.g	5e-77	Putative GAD isozyme
RT2083F04.g	2e-94	PH $\alpha$ -1 subunit precursor-like protein
ST1048E05.g	6e-123	Putative TPS
FL1144H01.g	1e-120	XDH, putative
RT1020E04.g	1e-101	** Putative uricase
FL1122D09.g	8e-58	** Putative lycopene $\epsilon$ -cyclase
FL3087G08.g	2e-58	NCED 1
SB1012G05.g	2e-66	* Putative IGP synthase
ST3126G01.g	4e-84	** Putative TrpDC
ST3111F12.g	2e-109	Lipoxygenase 2
RT1005D06.g	2e-99	* OPR
RT2032C05.g	3e-88	** Putative CAD
FL3016F01.g	3e-73	HMG-CoA reductase
LR1074D04.g	1e-59	Putative 6-phosphogluconolactonase
AD1C09B11.g	5e-82	Cytosolic 6-phosphogluconate DH
ST3135A03.g	9e-69	** Soluble acid invertase
RT1068C11.g	2e-115	* Enolase
CL3001C03.g	6e-106	** Citrate synthase, eukaryotic
CL3120C03.g	2e-108	fructose biphosphate aldolase
RT2086C11.g	4e-120	Putative Starch-branching enzyme
RT1013H04.g	6e-95	Putative glycolate oxidase
CL7C01B02.g	8e-84	Malate synthase, glyoxysomal
<b>Indução T2</b>		
LR2001F05.g	3e-58	Putative P5CS
LR1121C10.g	6e-18	P5CR
SB1117F02.g	5e-77	Putative GAD isozyme
RT2083F04.g	2e-94	PH $\alpha$ -1 subunit precursor-like protein
ST1048E05.g	6e-123	Putative TPS
RT3078G02.g	7e-126	Chloroplastic iron-SOD
FL1144H01.g	1e-120	XDH, putative
ST1014H12.g	8e-116	Putative AdoMet synthetase
FL8014D03.g	1e-83	Putative LDC-like protein
FL5022E11.g	2e-95	Spermidine synthase 1
SB1139F11.g	1e-58	Putative diamine oxidase
ST3111F12.g	2e-109	Lipoxygenase 2
LR1074D04.g	1e-59	Putative 6-phosphogluconolactonase
AD1C09B11.g	5e-82	Cytosolic 6-phosphogluconate DH
FL4020E07.g	7e-106	Chain C, Maize Transketolase In Complex With Tpp
RT2096B04.g	3e-75	Granule binding starch synthase II precursor
RT2086C11.g	4e-120	Putative Starch-branching enzyme
AM2053H08.g	2e-136	Starch branching enzyme rbe4
RT1013H04.g	6e-95	Putative glycolate oxidase
<b>Repressão T1</b>		
FL4045H06.g	8e-86	Putative prolyl aminopeptidase
HR1030B02.g	1e-96	Choline monoxygenase

**Tabela III. continuação****Repressão T1**

FL3025H03.g	3e-100	BADH
SB1123A10.g	2e-109	Putative TPS homolog
AD1039F02.g	1e-109	Putative TPP
FL5022E11.g	2e-95	* Spermidine synthase 1
RT3078G02.g	7e-126	* Chloroplasic iron-SOD
AD1048F08.g	7e-75	Peroxisome type APX
SD1038C01.g	9e-93	Cytosolic APX
RZ3040E04.g	6e-59	DHAR
RT3064H04.g	7e-84	* AnS $\alpha$ 1 subunit
AM2075F11.g	7e-124	Putative PAT
CL6059F09.g	2e-69	** Trp synthase $\beta$ -subunit
FL3060H09.g	1e-86	PAL
SB1C07G01.g	5e-53	COMT
FL1049D08.g	4e-65	Pentose-P epimerase
AD1C08A07.g	3e-92	Non-phosphorylating glyceraldehyde-3-P DH [NADP+]
LB2065F12.g	7e-85	Phosphoglycerate mutase
AD1010B09.g	6e-127	** Putative Aconitase
RZ3109C06.g	2e-64	Putative $\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase , E1 subunit
HR1088C07.g	2e-95	** Putative Succinyl CoA-synthetase (GDP-forming) $\beta$ -chain, mitochondrial precursor
RZ1022H10.g	6e-71	* Fumarase 1
LB2053D11.g	4e-110	Fructose-bisphosphate aldolase class-I
AD1068G10.g	1e-100	ADP- Glc pyrophosphorylase small subunit
FL5075A01.g	2e-95	Starch synthase DULL1
SB1052E09.g	2e-67	Starch phosphorylase H isozyme
SB1012G07.g	2e-82	RuBisCO small subunit
SB1091A09.g	1e-69	** Glucose-6-P isomerase, cytosolic
SB1123E03.g	7e-73	Putative glucose-6-P isomerase
AM1049C01.g	1e-72	UDP-Glc pyrophosphorylase
SD1044B02.g	1e-94	NADP-dependent malic enzyme
CL6005D11.g	1e-103	Putative isocitrate lyase
HR1018B10.g	2e-89	Glutamate dehydrogenase

**Repressão T2**

FL4045H06.g	8e-86	Putative prolyl aminopeptidase
SB1123A10.g	2e-109	Putative TPS homolog
AD1039F02.g	1e-109	Putative TPP
FL3012G11.g	6e-66	SOD[Cu-Zn] 2
AD1048F08.g	7e-75	Peroxisome type APX
RT1061B02.g	8e-128	Catalase-1
SB1012G05.g	2e-66	Putative IGP synthase
SB1001C12.g	7e-68	Putative nitrilase 1
SB1143H12.g	4e-97	Polyamine oxidase
HR1008H10.g	1e-75	PAL
SD1024F06.g	4e-86	Putative KAT
RZ1024A11.g	3e-94	Putative plastidic G6PDH
AM1006F12.g	3e-117	Putative PFK-PPi
AD1068G10.g	1e-100	ADP- Glc pyrophosphorylase small subunit
SB1123E03.g	7e-73	Putative glucose-6-P isomerase
AM1049C01.g	1e-72	UDP-Glc pyrophosphorylase

---

**Tabela III. continuação**

---

**Repressão T2**

---

HR1018B10.g	2e-89	Glutamate dehydrogenase
AD1056D04.g	3e-98	NADP-specific isocitrate dehydrogenase

---

**Tabela:** Genes com expressão diferencial significativa em análise estatística comparativa do log na base 2 da média das intensidades de sinal obtidas no tratamento por supressão de rega menos o log na base 2 da média das intensidades obtidas no controle para a cv tolerante (SP83-2847) versus o mesmo para a cv sensível (SP90-1638), após normalização dos dados de ambas as cultivares.

\*Genes com expressão diferencial significativa em análise estatística realizada a partir do log na base 2 das intensidades de sinal obtidas no tratamento por supressão de rega menos o log na base 2 da média das intensidades obtidas no controle, após normalização dos dados, para a cv tolerante (SP83-2847).

\*\*Genes com expressão diferencial significativa nos dois tipos de análise estatística mencionados acima.



**Tabela IV. Clones ESTs Diferencialmente Expressos na cv Sensível ao Déficit Hídrico (SP90-1638)**

<b>Identificação Clone</b>	<b>E Value</b>	<b>Descrição</b>
<b>Indução T1</b>		
SB1123A10.g	2e-109	Putative TPS homolog
AD1039F02.g	1e-109	Putative TPP
FL3025H03.g	3e-100	BADH
AM2093A01.g	1e-101	myo-inositol 1-P synthase
FL3012G11.g	6e-66	SOD[Cu-Zn] 2
AD1048F08.g	7e-75	Peroxisome type APX
SD1038C01.g	9e-93	Cytosolic APX
RZ3040E04.g	6e-59	DHAR
AM2075F11.g	7e-124	Putative PAT
SB1012G05.g	2e-66	Putative IGP synthase
SB1001C12.g	7e-68	Putative nitrilase 1
SD1048H01.g	2e-69	SAMDC
FL3060H09.g	1e-86	PAL
HR1008H10.g	1e-75	PAL
SB1C07G01.g	5e-53	COMT
FL1049D08.g	4e-65	Pentose-P epimerase
AM1049C01.g	1e-72	UDP-Glc pyrophosphorylase
AD1036C07.g	1e-87	Putative cytosolic phosphoglycerate kinase 1
AD1C08A07.g	3e-92	Non-phosphorylating glyceraldehyde-3-P DH [NADP+]
LB2065F12.g	7e-85	Phosphoglycerate mutase
RZ3109C06.g	2e-64	Putative $\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase , E1 subunit
LB2053D11.g	4e-110	Fructose-bisphosphate aldolase class-I
AD1068G10.g	1e-100	ADP- Glc pyrophosphorylase small subunit
FL5075A01.g	2e-95	Starch synthase DULL1
SB1052E09.g	2e-67	Starch phosphorylase H isozyme
SB1012G07.g	2e-82	RuBisCO small subunit
SB1091A09.g	1e-69	Glucose-6-P isomerase, cytosolic
SB1123E03.g	7e-73	Putative glucose-6-P isomerase
SD1044B02.g	1e-94	NADP-dependent malic enzyme
CL6005D11.g	1e-103	Putative isocitrate lyase
HR1018B10.g	2e-89	Glutamate dehydrogenase
SD2068B01.g	1e-56	PDK isoform 2
<b>Indução T2</b>		
FL4045H06.g	8e-86	Putative prolyl aminopeptidase
SB1123A10.g	2e-109	Putative TPS homolog
AD1039F02.g	1e-109	Putative TPP
FL3012G11.g	6e-66	SOD[Cu-Zn] 2
AD1048F08.g	7e-75	Peroxisome type APX
SD1038C01.g	9e-93	Cytosolic APX
RT1061B02.g	8e-128	Catalase-1
RT3064H04.g	7e-84	AnS $\alpha$ 1 subunit
SB1012G05.g	2e-66	Putative IGP synthase
SB1001C12.g	7e-68	Putative nitrilase 1
RT2021B04.g	4e-71	Allene oxide cyclase
SD1024F06.g	4e-86	Putative KAT
SB1143H12.g	4e-97	Polyamine oxidase
HR1008H10.g	1e-75	PAL

**Tabela IV. continuação****Indução T2**

SB1C07G01.g	5e-53	COMT
RZ1024A11.g	3e-94	Putative plastidic G6PDH
FL1049D08.g	4e-65	Pentose-P epimerase
AM1049C01.g	1e-72	UDP-Glc pyrophosphorylase
AM1006F12.g	3e-117	Putative PFK-PPi
LB2065F12.g	7e-85	Phosphoglycerate mutase
RZ3109C06.g	2e-64	Putative $\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase , E1 subunit
HR1088C07.g	2e-95	Putative Succinyl CoA-synthetase (GDP-forming) $\beta$ -chain, mitochondrial precursor
LB2053D11.g	4e-110	Fructose-bisphosphate aldolase class-I
AD1068G10.g	1e-100	ADP- Glc pyrophosphorylase small subunit
FL5075A01.g	2e-95	Starch synthase DULL1
SB1052E09.g	2e-67	Starch phosphorylase H isozyme
SB1012G07.g	2e-82	RuBisCO small subunit
SB1123E03.g	7e-73	Putative glucose-6-P isomerase
CL6056D07.g	2e-51	Putative alanine aminotransferase
CL6005D11.g	1e-103	Putative isocitrate lyase
HR1018B10.g	2e-89	Glutamate dehydrogenase
AD1056D04.g	3e-98	NADP-specific isocitrate dehydrogenase
CL6055H11.g	1e-104	UDP-glucose-4-epimerase

**Repressão T1**

LR2001F05.g	3e-58	Putative P5CS
LR1121C10.g	6e-18	P5CR
SB1117F02.g	5e-77	Putative GAD isozyme
RT2083F04.g	2e-94	PH $\alpha$ -1 subunit precursor-like protein
ST1048E05.g	6e-123	Putative TPS
FL1144H01.g	1e-120	XDH, putative
RT2050G12.g	2e-103	Putative uricase
RT3064H04.g	7e-84	AnS $\alpha$ 1 subunit
ST3126G01.g	4e-84	Putative TrpDC
FL3087G08.g	2e-58	NCED 1
ST3111F12.g	2e-109	Lipoxygenase 2
FL8014D03.g	1e-83	Putative LDC-like protein
FL5022E11.g	2e-95	Spermidine synthase 1
LV1008E05.g	2e-105	Peroxisomal copper-containing amine oxidase
FL3016F01.g	3e-73	HMG-CoA reductase
RT1018H09.g	2e-89	Cell wall invertase; $\beta$ -fructosidase; Incw4
LR1076F08.g	4e-67	Soluble acid invertase
RT2096B04.g	3e-75	Granule binding starch synthase II precursor
RT2086C11.g	4e-120	Putative Starch-branching enzyme
RT1013H04.g	6e-95	Putative glycolate oxidase
AM2061F10.g	2e-82	PEP carboxylase
CL7C01B02.g	8e-84	Malate synthase, glyoxysomal
LR1074D04.g	1e-59	Putative 6-phosphogluconolactonase

**Repressão T2**

LR2001F05.g	3e-58	Putative P5CS
LR1121C10.g	6e-18	P5CR
SB1117F02.g	5e-77	Putative GAD isozyme

**Tabela IV. continuação****Repressão T2**

RT2083F04.g	2e-94	PH $\alpha$ -1 subunit precursor-like protein
ST1048E05.g	6e-123	Putative TPS
RT3078G02.g	7e-126	Chloroplastic iron-SOD
FL1072A07.g	7e-113	MDHAR
FL1144H01.g	1e-120	XDH, putative
RT2050G12.g	2e-103	Putative uricase
ST3111F12.g	2e-109	Lipoxygenase 2
ST1014H12.g	8e-116	Putative AdoMet synthetase
FL8014D03.g	1e-83	Putative LDC-like protein
FL5022E11.g	2e-95	Spermidine synthase 1
SB1139F11.g	1e-58	Putative diamine oxidase
FL1C08B02.g	1e-92	Putative 4CL 1
FL3016F01.g	3e-73	HMG-CoA reductase
AD1C09B11.g	5e-82	Cytosolic 6-phosphogluconate DH
FL4020E07.g	7e-106	Chain C, Maize Transketolase In Complex With Tpp
FL5011A10.g	3e-74	Cell wall invertase
AM2132E11.g	6e-141	Sucrose synthase
RT1049G10.g	1e-95	Putative hexokinase 1
RT2096B04.g	3e-75	Granule binding starch synthase II precursor
RT2086C11.g	4e-120	Putative Starch-branching enzyme
AM2053H08.g	2e-136	Starch branching enzyme rbe4
AM1018H08.g	2e-96	triosephosphate isomerase 1
RT1013H04.g	6e-95	Putative glycolate oxidase
HR1084D12.g	1e-52	Putative GDC subunit
RT1057C06.g	4e-91	Putative hydroxypyruvate reductase
AM2061F10.g	2e-82	PEP carboxylase
RT2055G01.g	2e-117	Cytosolic PPK
LR1074D04.g	1e-59	Putative 6-phosphogluconolactonase

**Tabela:** Genes com expressão diferencial significativa em análise estatística realizada a partir do log na base 2 das intensidades de sinal obtidas no tratamento por supressão de rega menos o log na base 2 da média das intensidades obtidas no controle, após normalização dos dados, para a cv sensível (SP90-1638).

### 5.1.1 Osmoprotetores: ESTs Diferencialmente Expressas

O sistema de osmorregulação é uma das respostas defensivas aos estresses abióticos, tais como a seca, a salinidade, as temperaturas extremas e a alta intensidade luminosa. Os osmorreguladores: carboidratos, aminoácidos e compostos de amônia quaternária, desempenham um papel importante no ajustamento osmótico e na estabilização de células vegetais (CHA-UM *et al.*, 2006).

Após as análises estatísticas dos dados de macroarranjos, identificou-se na cultivar de cana-de-açúcar sensível ao déficit hídrico (SP90-1638), durante o déficit hídrico leve (T1) e severo (T2), a repressão de ESTs similares a genes da biossíntese do osmoprotetor prolina, quando comparadas as plantas tratadas com suas respectivas plantas-controle. Com relação à cv tolerante (SP83-2847), não houve diferença estatística significativa nos dois períodos de déficit hídrico quando se comparou as plantas tratadas com suas respectivas plantas-controle. Entretanto, na comparação do perfil de expressão da cv tolerante com o da cv sensível, observou-se que a primeira apresentou um maior acúmulo de transcritos de ESTs similares as enzimas  $\Delta$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) e  $\Delta$ -pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR). Isto pode ter ocorrido devido à cv tolerante sob déficit hídrico estar mantendo seus níveis de transcritos similares aos apresentados em condições de adequada hidratação (situação controle), uma vez que tais genes não sofreram repressão, ao passo que, na cv sensível, ocorre uma marcante repressão de genes relacionados à síntese deste osmoprotetor. Com isso a cv tolerante pode estar apresentando um conteúdo de prolina superior ao da cv sensível, o que estaria contribuindo com sua tolerância a deficiência hídrica. No entanto, uma EST similar à enzima prolil aminopeptidase (PAP, EC 3.4.11.5) foi induzida durante o estresse severo (T2) na cv sensível de cana. Esta enzima é uma protease responsável pela liberação de prolina a partir da posição N-terminal de um peptídeo (BOLUMAR *et al.*, 2003). Uma vez que esta cultivar apresentou, nos dois períodos de estresse, a repressão de ESTs similares às enzimas envolvidas na biossíntese de prolina a partir do glutamato, sua indução em T2 pode ser uma tentativa tardia de acumular este

aminoácido benéfico ou simplesmente um resultado do colapso celular, culminando com a ativação de proteases.

O aminoácido prolina acumula em muitas espécies vegetais sob uma ampla gama de estresses bióticos e abióticos (XIONG *et al.*, 2002; ÁBRAHÁM *et al.*, 2003). O acúmulo de prolina é observado sob condições limitadas de água (seca, salinidade ou estresse por frio) e durante processos de dessecação, tal como a maturação do pólen (DEUSCHLE *et al.*, 2004). A prolina pode ser sintetizada por duas vias diferentes em plantas, uma originária do glutamato através da ação das enzimas P5CS (EC 2.7.2.11 + 1.2.1.41) e P5CR (EC 1.5.1.2) e outra, que utiliza o aminoácido ornitina como precursor, através da ação da enzima ornitina- $\delta$ -aminotransferase ( $\delta$ -OAT, EC 2.6.1.68). Em plantas, a expressão de genes codificando enzimas-chave da síntese de prolina, *via* o aminoácido glutamato é controlada por estresses osmótico e salino (CLAUSSEN, 2005).

Sob condições de estresse, o acúmulo de prolina pode ocorrer por meio da indução da transcrição e/ou aumento da atividade de enzimas da biossíntese de prolina, da diminuição do catabolismo de prolina e/ou de sua liberação a partir de cadeias polipeptídicas e de peptídeos (ARMENGAUD, 2004; SHARMA & DIETZ, 2006). Os estudos realizados por Nayyar (2003) com milho e trigo sob déficit hídrico mostraram que a maior tolerância a este estresse foi observada em milho devido a sua maior capacidade de acumular prolina e que foi concomitante com uma atividade da enzima P5CR superior a observada em trigo.

A prolina assim como os demais solutos compatíveis apresenta baixo peso molecular, não é carregado em pH neutro, é altamente solúvel e em altas concentrações tem pouco ou nenhum efeito perturbador em interações macromolécula-solvente, ou seja, não é tóxica quando em altas concentrações (CHEN & MURATA, 2002). Ademais, ela age como uma fonte-reserva de carbono, nitrogênio e energia durante a recuperação do estresse, sendo rapidamente oxidada a glutamato (RAYMOND & SMIRNOFF, 2002). A síntese de prolina desempenha um papel fisiológico adicional, pois auxilia no controle redox ao consumir equivalentes redutores. Este consumo pode ser particularmente benéfico durante a desidratação pela razão deste estresse induzir uma perturbação nas cadeias de transporte de

elétrons, aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir de equivalentes redutores celulares (SERRANO & MONTESINOS, 2003). Todavia, além de contribuir na regulação do *status* redox celular, ao minimizar o acúmulo excessivo de NAD(P)H, ainda provém NAD<sup>+</sup> e NADP<sup>+</sup> necessários para manter os processos respiratórios e fotossintéticos.

Dentre os vários solutos compatíveis, a prolina tem mostrado proteger as plantas contra os danos induzidos pelo oxigênio singleto (estado excitado do oxigênio) e demais radicais livres. Devido à capacidade da prolina de eliminar o oxigênio singleto e radicais OH<sup>•</sup>, ela é capaz de estabilizar estruturas protéicas, DNA, bem como membranas e estruturas subcelulares contra a desnaturação (IYER & CAPLAN, 1998; MAGGIO *et al.*, 2002). A atividade de eliminação de radical hidroxila foi avaliada para o sorbitol, manitol, mio-inositol e prolina e foi constatado que a prolina é a molécula eliminadora de radical hidroxila mais eficaz (KAVI KISHOR *et al.*, 2005). A prolina parece também agir na regulação do pH, como um mecanismo para aliviar a acidez citosólica, que é uma condição freqüentemente associada ao estresse. Hare & Cress (1997) citam que segundo a literatura uma diminuição no pH intracelular tem sido implicada como um fator capaz de elicitar o acúmulo de prolina em plantas e, a remoção do excesso de H<sup>+</sup> devido à síntese de prolina preveniu uma depressão na respiração em plântulas de soja sob estresse salino ou por seca. Por fim, há relatos na literatura de que prolina pode ser um componente da cascata de sinalização molecular do estresse e um constituinte principal de proteínas da parede celular de plantas (NEPOMUCENO *et al.*, 2001; DEUSCHLE *et al.*, 2004).

A enzima prolil 4-hidroxilase (PH, EC 1.14.11.2) é uma dioxigenase vegetal que converte prolina a um aminoácido incomum denominado hidroxiprolina. Segundo Oda e colaboradores (2005) tem sido relatado na literatura que o aminoácido hidroxiprolina, da mesma forma que o aminoácido prolina, atua como um osmoprotetor em plantas sob estresses por seca e salinidade e que GABA e alanina são também produzidos em plantas sob estresse.

Uma EST similar ao gene da enzima PH mostrou-se reprimida na cv sensível de cana-de-açúcar (SP90-1638), durante o déficit hídrico leve (T1) e severo (T2), ao passo que, em análise estatística comparativa entre as duas cultivares nos períodos

T1 e T2, a cv tolerante (SP83-2847) apresentou valores que evidenciam acúmulo da EST similar a PH. Este resultado pode ser um indício da produção de hidroxiprolina concomitante com a de prolina e de que ambas, estejam agindo como eficientes osmoprotetores, minimizando na cv tolerante, os efeitos adversos decorrentes do déficit hídrico.

O “GABA Shunt” (Desvio do GABA), via que converte glutamato a succinato, via ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), tem sido associado a várias respostas fisiológicas, como na regulação do pH citosólico; no fluxo de carbono para dentro do ciclo de Krebs; no metabolismo de nitrogênio; na proteção contra o estresse oxidativo; na osmorregulação e na sinalização celular (BOUCHÉ & FROMM, 2004). O primeiro passo da via é uma descarboxilação direta e irreversível do glutamato pela enzima glutamato descarboxilase (GAD, EC 4.1.1.15), que leva à produção de GABA, um aminoácido não protéico de quatro carbonos conservado de bactérias às plantas e vertebrados. No entanto, GABA pode ser sintetizado também a partir do catabolismo da putrescina (via  $\gamma$ -aminobutiraldeído) através das reações catalisadas pelas enzimas diamino oxidase (DAO, EC 1.4.3.6) e  $\gamma$ -aminobutiraldeído desidrogenase (EC 1.2.1.19) ou por meio da enzima betaína aldeído desidrogenase (BADH, EC [1.2.1.8](#)), localizada no cloroplasto, que está envolvida na síntese de glicina betaína (SHELP *et al.*, 1999).

Tipicamente, os níveis de GABA em tecidos vegetais é baixo, mas aumenta diversas vezes em resposta a muitos estímulos, incluindo choque térmico, estimulação mecânica, estresse por seca, hipóxia e fitormônios (SHELP *et al.*, 1999). Tem sido mostrado que GABA é produzido intensamente e rapidamente em resposta aos estresses abióticos e bióticos, os quais induzem a atividade da enzima GAD dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina.

Na cv sensível de cana-de-açúcar (SP90-1638), nos dois períodos de déficit hídrico, T1 e T2, ocorreu a repressão de uma EST similar a GAD. Já na tolerante (SP83-2847), na análise comparativa entre as cultivares, essa mesma EST apresentou-se induzida nestes períodos, indicando que essa cultivar pode estar utilizando GABA como osmoprotetor, visto que o GABA não causa efeito tóxico quando em alta concentração e atua na eliminação de radical hidroxila (BOUCHÉ &

FROMM, 2004). Segundo Shelp e colaboradores (1999) estudos realizados em diferentes órgãos de *Petunia*, mostraram a presença de padrões de expressão diferencial de mRNA e proteína de GAD, sugerindo que a atividade de GAD é regulada tanto em nível transcricional como traducional. Oda e colaboradores (2005) examinaram a composição de aminoácidos da seiva do xilema em *Cucurbita maxima* tratadas com períodos de seca e reidratação. Os autores observaram que a concentração de metilglicina, hidroxiprolina, GABA, prolina e alanina na seiva do xilema da raiz aumentaram aproximadamente quatro vezes em plantas tratadas quando comparadas às plantas-controle, evidenciando que o tratamento foi eficiente para a indução desses osmoprotetores. Os autores sugerem que esses osmoprotetores induzidos podem contribuir nas respostas ao estresse via seiva do xilema. Ademais, Shelp e colaboradores (1999) citam que em altas concentrações, GABA estabiliza e protege tilacóides isolados contra os danos do congelamento na presença de sal, superando inclusive as propriedades crioprotetoras exibidas pela prolina e, que GABA possui atividade *in vitro* de eliminação de radical hidroxila superior a de prolina e glicina-betaína nas mesmas concentrações.

Em plantas superiores, a biossíntese de glicina betaína, que ocorre no cloroplasto, se dá através da oxidação do metabólito colina. Esta é uma reação de dois passos onde primeiramente colina é oxidada a betaína aldeído, pela colina monooxigenase (CMO, EC [1.14.15.7](#)), uma monooxigenase incomum dependente de ferredoxina (Fd). O segundo passo é a conversão de betaína aldeído à glicina betaína pela BADH, uma desidrogenase dependente de NAD<sup>+</sup> (KOTCHONI & BARTELS, 2003).

No presente estudo, no período de estresse T1, a cultivar de cana-de-açúcar sensível ao déficit hídrico (SP90-1638) apresentou a indução de uma EST similar ao gene da enzima BADH, ao passo que, a cv tolerante (SP83-2847), na análise estatística comparativa, mostrou inibição desta EST durante o período T1, bem como de uma EST similar à enzima CMO.

Wood e colaboradores (1996) isolaram e caracterizaram dois clones de cDNA de *Sorghum bicolor*, BADH1 e BADH15, que codificam a enzima BADH. Eles verificaram que os mRNAs de BADH1 e BADH15 foram induzidos sob déficit hídrico



e que sua expressão coincidiu com o acúmulo de glicina betaína, o qual contribuiu no ajustamento osmótico da planta. Segundo Cha-Um e colaboradores (2006), o acúmulo de glicina betaína pode contribuir significativamente para o ajustamento osmótico, facilitando a manutenção do volume do cloroplasto e da capacidade fotossintética de folhas com baixo potencial hídrico. Além disso, segundo estes autores, no estresse salino, o principal papel da glicina betaína seria, provavelmente, o de proteção das células vegetais por meio da preservação do balanço osmótico; da estabilização da estrutura de proteínas-chave, tal como a Rubisco; da proteção do aparato fotossintético e de sua atuação como eliminadora de espécies reativas de oxigênio (ROS).

No tocante a via biossintética do osmoprotetor trealose, foi possível observar, nos dois períodos de estresse T1 e T2, que a cv sensível de cana-de-açúcar (SP90-1638), bem como a cv tolerante (SP83-2847) apresentaram a indução de ESTs similares ao gene da enzima trealose-6-fosfato sintase (TPS, EC 2.4.1.15), muito embora somente a cv sensível tenha apresentado indução de uma EST similar a enzima subsequente da via biossintética, ou seja, da trealose-6-fosfato fosfatase (TPP, EC [3.1.3.12](#)), uma vez que na tolerante ocorreu a repressão da mesma.

A trealose é um dissacarídeo não reduzido presente em uma ampla gama de organismos, tais como bactéria, algas, fungos, animais invertebrados e plantas (WINGLER *et al.*, 2000; CHEN & HADDAD, 2004; SCHLUEPMANN *et al.*, 2004; KOSMAS *et al.*, 2006). Na maioria das plantas a trealose está presente em quantidades-traço exceto em “plantas de ressurreição”, tal como *Selaginella lepidophylla*, onde se acumula em altos níveis durante a dessecação.

A via de biossíntese da trealose ocorre em duas reações, sendo a primeira catalisada pela enzima TPS e envolve a transferência de glicose a partir de UDP-glicose a glicose-6-fosfato, formando, dessa forma, trealose-6-fosfato (T6P) e UDP. Na segunda reação, a enzima TPP então converte trealose-6-fosfato (T6P) em trealose livre (CHEN & HADDAD, 2004; SCHLUEPMANN *et al.*, 2004; KOSMAS *et al.*, 2006).

A trealose pode servir como reserva energética e na proteção ao estresse; na literatura tem sido mostrado que este dissacarídeo é capaz de estabilizar e proteger

proteínas e membranas da desnaturação. Sua formação é induzida em uma variedade de organismos sujeitos aos estresses causados pela seca, salinidade, calor ou congelamento. Chen e Haddad (2004) mencionam que o aumento da expressão de genes de síntese de trealose em plantas, usando técnicas transgênicas, aumentou a resistência à seca e à dessecação. Garg e colaboradores (2002), em seu trabalho realizado com plantas de arroz, super-expressaram genes de *Escherichia coli* da biossíntese de trealose (*otsA* e *otsB*) sob o controle de promotores dependentes de estresse. As plantas transgênicas de arroz acumularam trealose em níveis superiores aos das plantas controle (não transgênicas), cerca de três a 10 vezes mais. Comparadas com o arroz não transgênico, diversas linhas transgênicas exibiram a manutenção do crescimento vegetal, menor dano foto-oxidativo e um balanço mineral mais favorável sob condições de estresses causados pela seca, salinidade e baixa temperatura. Todavia, alguns autores têm relatado que em experimentos de transgenia em tabaco e batata para a expressão de genes da biossíntese de trealose, embora o seu acúmulo tenha possibilitado às plantas transgênicas uma maior tolerância à seca, em contrapartida, exibiram várias mudanças morfológicas, as quais variaram de um severo retardo no crescimento e amarelecimento, folhas em forma de lança, redução nos níveis de sacarose e desenvolvimento anômalo das raízes (CHEN & MURATA, 2002).

Segundo Kosmas e colaboradores (2006), tem sido relatado que a trealose induz enzimas envolvidas no acúmulo de carboidratos de reserva, tal como o amido. Os autores mencionam também que a via biossintética da trealose é ubíqua em plantas e que recentes achados em *Arabidopsis* mostraram que a trealose é indispensável para a utilização de carboidrato durante o crescimento e desenvolvimento vegetal. Há forte evidência de que este papel é desempenhado pela trealose-6-fosfato (T6P), a qual atuaria como uma molécula sinal no metabolismo de carboidrato. Wingler e colaboradores (2000) analisaram em *Arabidopsis* o modo pelo qual a trealose altera o metabolismo e o desenvolvimento vegetal e como ela afeta a expressão gênica mediada por açúcares. Em seus resultados mostraram que a trealose induz especificamente a expressão do gene *ApL3*, que codifica uma subunidade maior da ADP-glicose pirofosforilase (ADP-Glc-

PPase, EC 2.7.7.27), a primeira enzima na biossíntese de amido. Em adição, citam que a atividade de ADP-Glc-PPase aumentou e o amido acumulou nos tecidos-fontes, levando a um suprimento reduzido de carbono nas raízes e nas folhas em desenvolvimento.

Em concordância com a literatura, no presente trabalho foi encontrado, na cultivar sensível de cana-de-açúcar (SP90-1638), a indução de uma EST similar ao gene da enzima ADP-Glc-PPase. Em decorrência de, a cultivar sensível estar apresentando, nos dois períodos de estresse T1 e T2, a indução de ESTs correspondentes a via da trealose, levando possivelmente a sua produção, a indução de genes da via de síntese de amido observada nos mesmos períodos é plausível. Como a cv sensível está reprimindo, nos períodos em estudo, uma EST similar a amido sintase ligada ao grânulo, é possível que a produção de amilose esteja ocorrendo por meio de uma outra enzima denominada amido sintase (EC 2.4.1.21) e, de fato, uma EST com similaridade a esta enzima foi induzida.

Por fim, ainda com respeito à produção de solutos compatíveis, a cv sensível de cana-de-açúcar apresentou indução, durante T1, de uma EST similar ao gene da enzima mio-inositol-1-fosfato sintase, que realiza o primeiro passo da via biossintética de pinitol, o qual atua como um osmoprotetor e no ajustamento osmótico em várias plantas em resposta ao estresse. No trabalho de Ishitani e colaboradores (1996) também foi detectado um aumento do transcrito da enzima mio-inositol fosfato sintase em *Mesembryanthemum crystallinum* (planta do gelo) quando submetida ao estresse salino.

O osmólito pinitol é um álcool de açúcar cíclico que acumula em uma variedade de espécies expostas constantemente a condições salinas (espécies halófitas) e naquelas adaptadas a seca. Em folhas, pinitol está localizado nos cloroplastos e citosol. A biossíntese de pinitol se dá através da metilação de mio-inositol ao intermediário ononitol que, em seguida, por epimerização é convertido a pinitol (BRAY *et al.*, 2000).

### **5.1.2 Terpenos e Hormônios Vegetais: ESTs Diferencialmente Expressas**

Em plantas, mais de 22.000 isoprenóides têm sido identificados. Estes compostos, tais como os esteróis e ubiquinonas, reguladores de crescimento (giberelinas, ABA, brassinosteróides e citocininas), certas fitoalexinas e outros terpenos especializados são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal e na defesa contra patógenos. Na biossíntese de isoprenóides (terpenos), a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintase (HMGS, EC 4.1.3.5) converte acetil-CoA e acetoacetil-CoA em hidroximetilglutaril CoA (HMG-CoA). A enzima hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMGR, EC 1.1.1.34), que é a enzima chave reguladora da via, reduz então o HMG-CoA à ácido mevalônico (mevalonato), o qual é subseqüentemente convertido a isopentenil pirofosfato, precursor universal dos isoprenóides. Há relatos na literatura de mudanças na expressão de HMGR em resposta a ferimento e/ou ataque de patógeno (ALEX *et al.*, 2000; JAIN *et al.*, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2004).

A cv sensível de cana (SP90-1638), de acordo com a análise estatística, apresentou, nos dois períodos estudados, repressão de uma EST similar ao gene da enzima HMGR, enquanto que, na análise estatística comparativa entre as duas cultivares, durante o período T1, a cv tolerante de cana (SP83-2847) apresentou um maior acúmulo desta EST, o que pode estar contribuindo para a síntese de ABA, visto que, uma EST similar a enzima 9'-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED) apresentou um maior acúmulo de transcrito na cv tolerante quando comparada com a cv sensível, que mostrou repressão desta EST similar a NCED.

O ácido abscísico (ABA), um importante inibidor do crescimento vegetal sintetizado nos cloroplastos e outros plastídeos, é um composto terpenóide de 15 carbonos derivado de uma porção terminal dos carotenos. Os níveis de ABA variam muito em resposta a mudanças no desenvolvimento e no ambiente. Sua síntese é induzida durante a deficiência hídrica na planta, sendo provavelmente a resposta mais relacionada ao estresse hídrico; seus níveis na folha podem ser elevados 50 vezes. O ABA está envolvido tanto nos efeitos fisiológicos de curto prazo, por exemplo, fechamento estomático, minimizando a perda de água pela transpiração quanto nos processos de longo prazo do desenvolvimento, por exemplo, maturação de sementes. Ademais está diretamente envolvido na regulação de alguns genes

responsivos ao estresse hídrico (família LEA, chaperonas, canais de água e íons, enzimas que catalisam o metabolismo de solutos compatíveis ou que destoxificam ROS), visto que o ABA ativa a transcrição destes genes através da indução de fatores de transcrição (rota de transdução de sinal ABA-dependente) (CROZIER, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2004).

Nas plantas superiores, a síntese de ABA, denominada via biossintética indireta (C<sub>40</sub>), se dá pela clivagem de um precursor carotenóide de 40 carbonos (violaxantina), sintetizado a partir do isopentenil pirofosfato via a rota de terpenos do plastídeo. A síntese da violaxantina é catalisada pela enzima zeaxantina epoxidase (ZEP). Posteriormente a violaxantina é convertida a 9'-cis-neoxantina e então a xantoxal pela enzima 9'-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED), assim chamada porque pode clivar tanto o 9'-cis-violaxantina quanto o 9'-cis-neoxantina. A síntese da NCED é rapidamente induzida pelo estresse hídrico, sugerindo que a reação que ela catalisa é uma etapa-chave de regulação na síntese do ABA. Por último, o xantoxal é convertido a ABA por meio de etapas oxidativas (CROZIER, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2004).

De acordo com a análise estatística comparativa entre as duas cultivares, a tolerante (SP83-2847) apresentou indução de uma EST similar ao gene da enzima lipoxigenase (LOX, EC 1.13.11.12) durante os estresses leve (T1) e severo (T2), ao contrário, a cv sensível (SP90-1638) mostrou repressão desta EST nos mesmos períodos de déficit hídrico. Além disso, foi induzida na cv tolerante, durante o período T1, uma EST similar ao gene da enzima ácido 12-oxo-fitodienólico redutase (OPR, EC 1.3.1.42). A indução de tais enzimas indicam que a cv tolerante de cana-de-açúcar pode estar induzindo a biossíntese de jasmonatos (JAs), os quais têm sido implicados em vários processos fisiológicos, incluindo respostas de defesa. Somente no estresse severo (T2) a cv sensível mostrou indução de uma EST similar à enzima aleno óxido ciclase (AOC, EC 5.3.99.6) e outra similar à enzima 3-cetoacil-coA tiolase (KAT), o que pode significar uma tentativa tardia, da cv sensível, de induzir estes hormônios vegetais.

Em vegetais, o ácido jasmônico (JA) e seu metil éster aromático e volátil, o metil jasmonato (MeJA), coletivamente chamados de jasmonatos (JAs), são

derivados de ácidos graxos de 12 carbonos, sintetizados através da via octadecanóide a partir do ácido linolênico de 18 carbonos, o qual é liberado dos lipídeos da membrana plasmática. A LOX promove a oxigenação do ácido linolênico até a formação do ácido 13-hidroperoxilinolênico. Em seguida, o ácido 12-oxo-fitodienólico é formado a partir da ciclização do anel ciclopentanona e com três ciclos sucessivos de  $\beta$ -oxidações, que encurtam a cadeia lateral, ocorre a produção final do JA (HE *et al.*, 2002). O JA induz a transcrição de muitos genes envolvidos no metabolismo de defesa vegetal e, os mecanismos dessa ativação gênica estão sendo esclarecidos. Os níveis de JA aumentam rapidamente em resposta ao dano causado por diferentes herbívoros e desencadeia a formação de muitos tipos diferentes de defesas vegetais, além dos inibidores de protease, incluindo terpenos e alcalóides (REYMOND & FARMER, 1998; TAIZ & ZEIGER, 2004).

Nos trabalhos de Bray (2002) em *Arabidopsis thaliana* submetida ao estresse por déficit hídrico e de Ozturk e colaboradores (2002) em cevada submetida ao estresses causados pela seca e elevada salinidade, em que ambos foram realizados por meio do monitoramento de mudanças na abundância de transcritos, foi observada indução de genes da via de síntese de JA, da mesma forma que o observado no presente trabalho realizado em cana-de-açúcar sob déficit hídrico, evidenciando que este hormônio parece estar envolvido nas respostas a estresses abióticos como a seca, da mesma forma que nas respostas aos estresses bióticos como os causados pelo ataque de insetos, patógenos e/ou pelo ferimento.

Nas duas cultivares estudadas, diferentes ESTs com similaridade a genes de enzimas da biossíntese de triptofano e do hormônio vegetal auxina (ácido indol-3-acético ou AIA) apresentaram expressão diferencial. Em *Arabidopsis*, a via do triptofano não leva somente a biossíntese de triptofano e do hormônio vegetal AIA, mas também a síntese da fitoalexina camalexina e de outros compostos secundários (ZHAO *et al.*, 1998; CHEONG *et al.*, 2002).

No estresse leve (T1), embora a cultivar sensível tenha apresentado repressão de EST similar a enzima antranilato sintase (AnS, EC [4.1.3.27](#)) e triptofano descarboxilase (TrpDC, EC [4.1.1.28](#)), ela apresentou indução de ESTs similares a fosforibosilantranilato transferase (PAT, EC [2.4.2.18](#)) e a indol-3-glicerol-fosfato

sintase (IGP sintase, EC [4.1.1.48](#)) e nitrilase (EC [3.5.5.1](#)), sendo que, as duas últimas também mostraram-se induzidas durante o estresse severo (T2). Ao passo que, no período T1, a cultivar tolerante apresentou indução de EST similar a enzima IGP sintase e da TrpDC e repressão de uma EST similar a enzima AnS e da subunidade  $\beta$  da triptofano sintase (Trp sintase, EC [4.2.1.20](#)). Com respeito a esta última enzima, Ozturk e colaboradores (2002) observaram em folhas de cevada submetida à seca, a indução da subunidade  $\beta$  da Trp sintase.

A indução de enzimas da via de síntese do triptofano em cana-de-açúcar é um resultado que está de acordo com a literatura, na qual se relata que devido ao estresse observa-se a indução da biossíntese de aminoácidos aromáticos, tais como triptofano, fenilalanina e tirosina (CORUZZI & LAST, 2000).

O hormônio vegetal, auxina (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. No entanto, a biossíntese de AIA independente do triptofano tem sido demonstrada, embora a via precisa permaneça ainda indefinida. O ponto precursor de ramificação da biossíntese independente do triptofano é duvidoso, o qual pode ser a partir do indol ou do indol-3-glicerol fosfato.

Da mesma forma que no trabalho de Bray (2002) realizado com *Arabidopsis thaliana* submetida ao déficit hídrico, a cv sensível de cana apresentou indução de EST similar ao gene da nitrilase, a qual pode fazer parte da biossíntese dependente do triptofano, através da rota IAN (rota do indol-3-acetonitrila), que converte IAN a AIA por meio da ação da nitrilase. 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. Como a cv sensível está induzindo ESTs das enzimas IGP sintase e nitrilase, a rota independente do triptofano é que parece estar sendo utilizada.

Embora o AIA seja um importante hormônio de crescimento, ele também é responsável pela indução de genes de resposta ao estresse, tal como à lesão. Vários

genes, que codificam as enzimas glutationa-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. Da mesma forma, a ACC sintase, também induzida pelo estresse e etapa limitante na biossíntese de etileno, é induzida por altos níveis de AIA (CROZIER *et al.*, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2004).

No entanto, com relação à cv tolerante de cana é plausível considerar duas possibilidades, uma é de que ela esteja utilizando a via de síntese de AIA dependente do triptofano, visto que, ela apresentou indução das enzimas IGP sintase e TrpDC. A enzima TrpDC faz parte da rota TAM (rota da triptamina), produzindo a triptamina que, em seguida, pela ação de outras enzimas é convertida a AIA. A outra possibilidade é de que a triptamina produzida pela enzima TrpDC esteja sendo direcionada para a síntese de uma fitoalexina denominada camalexina. A síntese de fitoalexinas é a resposta de defesa a patógenos mais bem estudada.

### **5.1.3 Defesa Antioxidante: ESTs Diferencialmente Expressas**

O oxigênio é essencial para a existência da vida aeróbica, mas subprodutos tóxicos, denominados espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) são gerados em todas as células aeróbicas durante o metabolismo celular normal (respiração, fotossíntese, fotorrespiração e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos) nas organelas subcelulares: mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos e glioxissomos (GUAN *et al.*, 2000; XIONG & ZHU, 2002). No entanto, os níveis de ROS aumentam como consequência de várias injúrias do meio, as quais as plantas estão expostas, tais como déficit hídrico (JIANG & ZHANG, 2002), temperatura, privação de oxigênio (BLOKHINA *et al.*, 2003), elevada intensidade luminosa (APEL & HIRT, 2004), estresse salino (HERNÁNDEZ *et al.*, 2000), estresse mecânico ou mesmo poluentes.

As ROS podem reagir com uma variedade de biomoléculas, alterando ou bloqueando suas funções biológicas, causando danos em componentes celulares, tais como lipídios de membranas, inativando enzimas (desnaturação), carboidratos,



ácidos nucleicos e ao complexo fotossistema II (ARORA *et al.*, 2002). Estas injúrias causadas pelas ROS são conhecidas como estresse oxidativo e constituem um dos principais fatores de dano, tanto em nível celular quanto molecular, em plantas expostas aos estresses do meio, levando a redução de sua produtividade (KWON *et al.*, 2002; PASTERNAK *et al.*, 2005). Para minimizar os efeitos tóxicos das ROS as plantas utilizam mecanismos enzimáticos e não enzimáticos altamente regulados para manter um balanço entre a produção e a destruição de ROS de modo a manter a homeostase redox celular (SAIRAM & TYAGI, 2004).

A partir da análise estatística comparativa entre as cultivares, observou-se na cv tolerante (SP83-2847), durante os tratamentos de déficit hídrico T1 e T2, a indução de um menor número de ESTs similares aos genes de enzimas de defesa antioxidante, o que poderia ser devido a uma capacidade desta cultivar de evitar uma explosão oxidativa ao produzir eficientes osmoprotetores, tais como prolina, hidroxiprolina e GABA. A cv sensível (SP90-1638), ao contrário, apresentou a indução de um maior número de ESTs similares aos genes de enzimas do sistema de defesa antioxidante.

Segundo Soares Netto (2001) as plantas apresentam mecanismos para combater os efeitos tóxicos das ROS. A primeira linha de defesa antioxidante envolve a prevenção da formação de ROS, enquanto que, a segunda linha de defesa antioxidante é composta por enzimas e compostos antioxidantes de baixo peso molecular. Se a primeira linha de defesa antioxidante fracassar na prevenção da formação das ROS, componentes antioxidantes as decompõem evitando a formação de lesões oxidativas nas biomoléculas.

Chen & Murata (2002) mencionam que diversos estudos têm mostrado que as ROS são eliminadas por solutos compatíveis, resultando na proteção das plantas contra as condições adversas do estresse. Estes autores citam que, em experimentos *in vitro*, alguns solutos compatíveis, tais como manitol, prolina e sorbitol, mas não a glicina-betaína, mostraram-se efetivos eliminadores de ROS e que, plantas transgênicas que sintetizam solutos compatíveis, com exceção de glicina-betaína, exibiram tolerância aumentada ao estresse oxidativo.

A cv sensível (SP90-1638) apresentou a indução de um número maior de ESTs similares às enzimas do sistema de defesa antioxidante, como, por exemplo, da ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) tanto a do citosol quanto a do peroxissomo, durante os períodos de estresse T1 e T2. Quando da análise estatística comparativa, a cultivar tolerante apresentou repressão destas ESTs nos mesmos períodos de estresse. Sendo assim, parece que a cultivar sensível está necessitando acionar o sistema de defesa antioxidante para combater um provável estresse oxidativo decorrente do déficit hídrico.

Também foi observado que a cv sensível apresentou, durante T1 e T2, a indução de EST similar a superóxido dismutase citoplasmática (SOD[Cu-Zn]<sub>2</sub>, EC 1.15.1.1), enquanto que, a cv tolerante apresentou repressão para a mesma EST no período de estresse T2, muito embora tenha apresentado, durante o mesmo período T2, um acúmulo de transcrito similar a SOD-ferro presente no cloroplasto (SOD-ferro, EC 1.15.1.1). Com o acentuado nível de estresse, a atividade da SOD-ferro torna-se necessária para conter os efeitos drásticos do déficit hídrico. Segundo Nepomuceno e colaboradores (2001), o déficit hídrico quebra o equilíbrio oxidativo/reduutivo (redox) em várias organelas celulares, tal como o cloroplasto. O declínio na funcionalidade dos cloroplastos, inevitavelmente, leva à geração de espécies com radicais de oxigênio altamente reativos (ROS).

Na cv sensível, durante o estresse severo (T2), ocorreu um aumento na expressão de uma EST com similaridade a isoforma 1 da enzima catalase (CAT1, EC 1.11.1.6), a qual se localiza nos peroxissomos. A partir da análise estatística comparativa observou-se que esta mesma EST foi reprimida na cv tolerante; no entanto, esta análise mostrou que, nos dois períodos de estresse, uma EST similar à enzima xantina desidrogenase (XDH, EC 1.1.1.204) foi significativamente induzida na tolerante, ao passo que na cv sensível mostrou inibição. A enzima XDH é uma desidrogenase dependente de NAD<sup>+</sup> que catalisa as duas reações finais do catabolismo de purinas e está relacionada ao metabolismo antioxidante (NOGUEIRA *et al.*, 2003). Consistente com a indução da XDH, a cv tolerante também apresentou a indução de ESTs similares a enzima uricase (EC [1.7.3.3](#)). Na cv sensível (SP90-

1638), ESTs similares a estas duas enzimas do catabolismo de purinas foram reprimidas.

#### **5.1.4 Biossíntese de Fenilpropanóides: ESTs Diferencialmente Expressas**

Nos dois períodos de déficit hídrico, foi possível observar, na cultivar sensível (SP90-1638), a indução de ESTs similares a enzimas de síntese de fenilpropanóides, os quais são importantes unidades básicas para a formação de compostos fenólicos mais complexos. Tais ESTs induzidas são similares às enzimas fenilalanina amônia liase (PAL, EC 4.3.1.5) e a ácido caféico 3-O- metiltransferase (COMT, EC 2.1.1.6 ou EC 2.1.1.68). A enzima PAL é considerada a principal enzima que leva a síntese dos fenilpropanóides e, conseqüentemente, pode proteger as plantas de vários estresses bióticos e abióticos (HERRIG *et al.*, 2002). Entretanto, no período T2, a cv sensível apresentou repressão de uma EST similar a 4-coumarato:CoA ligase (4CL, EC [6.2.1.12](#)), que também desempenha um papel-chave no metabolismo geral de fenilpropanóides. Já a cultivar tolerante (SP83-2847) apresentou indução, no período T1, de uma EST similar à enzima cinamil álcool desidrogenase (CAD, EC [1.1.1.195](#)), que catalisa o último passo da biossíntese de monômeros de lignina.

França e colaboradores (2001) mencionam que na maioria dos sistemas estudados, a indução da síntese de fenilpropanóides e isoprenóides sob condições de estresse é o resultado do aumento da transcrição de genes codificando as enzimas biossintéticas correspondentes.

Os compostos fenólicos são biossintetizados por meio de diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese dos compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico, que participa da biossíntese da maioria dos fenóis vegetais e, a rota do ácido malônico menos significativa nas plantas superiores. A rota oxidativa das pentoses fosfato desempenha diversos papéis no metabolismo vegetal, por exemplo, um intermediário nesta rota, a eritrose-4-fosfato de quatro carbonos, combina-se com o PEP, resultante da glicólise, na reação inicial que produz compostos fenólicos vegetais, incluindo aminoácidos

aromáticos e precursores da lignina, flavonóides e fitoalexinas. Sendo assim, a rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota da pentose fosfato em aminoácidos aromáticos, tais como fenilalanina, tirosina e triptofano (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A classe mais abundante de compostos fenólicos secundários em plantas é derivada da fenilalanina, por meio da eliminação de uma molécula de amônia e formando o ácido cinâmico. Essa reação é catalisada pela PAL, talvez a enzima mais estudada no metabolismo secundário vegetal. A PAL está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, de forma que a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos. A atividade da PAL é aumentada por fatores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, luz, ferimento, ataque de patógeno, baixa temperatura e por outras condições de estresses. O ponto de controle desta enzima parece estar no início da transcrição. A invasão de fungos, por exemplo, desencadeia a transcrição do RNA mensageiro que codifica a PAL o que, então, estimula a síntese de compostos fenólicos na planta (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Segundo Herrig e colaboradores (2002), os diversos metabólitos fenólicos produzidos através da via de fenilpropanóides são frequentemente induzidos e desempenham papéis específicos na proteção da planta contra estresses bióticos e abióticos. De acordo com Bray (2002), os genes envolvidos no metabolismo de fenilpropanóides têm uma função em potencial como antioxidantes. A autora menciona que os fenilpropanóides e os compostos fenólicos apresentam propriedades de captação de radicais livres.

Riccardi e colaboradores (1998), em estudo proteômico observaram o acúmulo de proteínas similares à enzima COMT, nas regiões basais de folhas de milho submetido ao estresse hídrico progressivo, durante seu crescimento, e sugerem a ativação da via de síntese de lignina em decorrência do estresse hídrico. Eles mencionam que, segundo a literatura, em estudos em sorgo sob estresse hídrico severo, o reforço da parede celular pela deposição de lignina em raízes durante este estresse poderia representar um aumento de resistência da planta contra a diminuição do turgor e a necessidade de restringir a perda de água a partir

dos tecidos internos. Em outro estudo em uma espécie de pinheiro, eles mencionam que foi observado a indução de proteínas, tal como a enzima COMT, relacionadas à via de fenilpropanóides, via esta que não é específica para a síntese de lignina, uma vez que, também pode estar relacionada ao acúmulo de ácido ferúlico. E, a quantidade de ácido ferúlico ligado a polissacarídeos da parede está negativamente correlacionada a extensibilidade da parede. De acordo com os autores, tem sido proposto que o endurecimento da parede em folhas de milho sob estresse osmótico é uma resposta ao déficit hídrico e permite a redução das taxas de crescimento.

No entanto, Vincent e colaboradores (2005) baseados nos perfis de expressão proteômica de COMT e outras enzimas envolvidas na síntese de lignina concluíram que nenhuma mudança na composição de lignina foi observada em função do déficit hídrico, visto que, consistente com os baixos níveis dessas enzimas, o nível de lignina foi menor em folhas de plantas sujeitas ao déficit hídrico do que nas folhas de plantas irrigadas. Os autores sugerem que a diminuição da lignificação é uma resposta adaptativa a seca, uma vez que o acúmulo contínuo de lignina na ausência de crescimento poderia levar a lignificação da zona de alongamento, comprometendo o crescimento durante a recuperação em condições de reidratação.

Considerando tais hipóteses propostas na literatura, o perfil de indução de ESTs similares a enzimas da via de fenilpropanóides pode ou não estar representando um benefício para ambas as cultivares de cana-de-açúcar sob déficit hídrico.

### **5.1.5 Outras ESTs Diferencialmente Expressas**

Na cultivar sensível (SP90-1638), ocorreu a indução, durante os dois períodos estudados, de uma EST similar a glutamato desidrogenase (GDH, EC 1.4.1.2), enzima que catalisa uma reação reversível que sintetiza ou desamina o glutamato. Segundo Khadri e colaboradores (2001), a GDH parece desempenhar um papel secundário na biossíntese de glutamato, estando principalmente envolvida em sua oxidação. Como os resultados de expressão diferencial apontam para uma repressão de genes que utilizam o glutamato para a síntese de prolina, pode ser que esta

cultivar esteja agindo no sentido da reação de desaminação do glutamato, utilizando água e  $\text{NAD}^+$  e produzindo 2-oxoglutarato e amônio. Ademais, esta cultivar exibiu indução de uma EST similar à enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, a qual poderia estar utilizando, no ciclo do ácido cítrico, o 2-oxoglutarato, produzido pela enzima GDH.

Riccardi e colaboradores (1998) estudando mudanças no *pool* de proteínas em folhas de milho submetido ao estresse hídrico progressivo, observaram a indução de diversas proteínas, cujas funções embora não estejam diretamente relacionadas ao estresse, mostraram-se em níveis aumentados durante o estresse por seca. Estas são enzimas envolvidas em importantes vias metabólicas de plantas superiores, como glicólise, síntese de SAM entre outras.

Além das suas atividades na glicólise, algumas enzimas glicolíticas podem, de fato, desempenhar outras funções. Por exemplo, em *Echinochloa phyllogon*, a enolase, induzida em condições de estresse como anoxia, frio ou calor excessivo, pode atuar como uma proteína de proteção da estrutura dos componentes celulares (MARENCO & LOPES, 2005).

Similar ao observado por Riccardi e colaboradores (1998), em seu estudo com folhas de milho submetido a um déficit hídrico progressivo, observou-se no presente estudo, a indução de EST similar à enzima enolase (EC 4.2.1.11), na cv tolerante, e de EST similar à enzima frutose bifosfato aldolase cloroplasmática (EC 4.1.2.13) na cv sensível. Segundo os autores a enolase está envolvida na resposta aos estresses ambientais, tais como no estresse anaeróbico em raízes de milho, no choque térmico em leveduras e em plantas durante o estresse salino, tratamento com ABA e estresse hídrico. Em algumas plantas, a enolase é reconhecida como uma proteína de choque térmico, ocorrendo aumento em sua concentração, quando expostas ao estresse por calor. Em milho, a atividade da enzima aumenta cinco vezes mais quando o tecido é submetido ao estresse por anaerobiose, possivelmente para facilitar um aumento na produção de ATP na ausência de fosforilação oxidativa (DENNIS & BLAKELEY, 2000).

Na cv sensível de cana-de-açúcar, uma EST similar à enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase “nonphosphorylating” [ $\text{NADP}^+$ ] (EC 1.2.1.9) foi induzida em T1,

bem como foi induzida em T2, uma EST similar a fosfofrutoquinase dependente de pirofosfato (PFK, EC [2.7.1.90](#)).

As plantas apresentam um metabolismo altamente flexível o que possibilita acomodarem-se metabolicamente às mudanças do meio. Um dos atributos que permitem esta plasticidade de seu metabolismo é a presença de mais de uma enzima capaz de catalisar um passo específico, constituindo assim as reações de desvio (*bypass*). Um exemplo é a glicólise em que há três reações que requerem adenina nucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ). As plantas possuem três enzimas que desviam dessas reações glicolíticas: a PFK; a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase “nonphosphorylating” [ $\text{NADP}^+$ ], que produz apenas NADPH e 3-fosfoglicerato e a PEP fosfatase. A função destes desvios não é completamente compreendida, mas acredita-se de que eles possam proporcionar às plantas a capacidade de resistir aos estresses que ocorrem durante a escassez de fosfato, que é uma condição comum. Sob estas condições, as concentrações de adenilato nucleotídeos são severamente reduzidas e reações que requerem ADP ou ATP podem vir a ser inibidas. As enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase “nonphosphorylating” [ $\text{NADP}^+$ ] e PEP fosfatase podem atuar como “desvio” das reações que requerem ADP como um substrato, permitindo ao carbono passar pela glicólise sem a necessidade de síntese de ATP. Conseqüentemente, a presença de enzimas *bypass* pode permitir que o fluxo de carbono continue sob condições adversas (DENNIS & BLAKELEY, 2000).

## VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- O uso de ESTs geradas pelo projeto SUCEST-FAPESP aliado à técnica de macroarranjos de cDNA revelou-se uma excelente ferramenta de prospecção para a detecção do perfil de expressão de um grande número de genes em cana-de-açúcar sob déficit hídrico;
- A cultivar tolerante de cana-de-açúcar (SP83-2847) apresentou um número menor de genes diferencialmente expressos, o que pode significar que sua tolerância esteja relacionada à sua capacidade de manter a expressão gênica inalterada mesmo quando exposta a uma condição ambiental adversa;
- A cultivar sensível (SP90-1638) respondeu imediatamente ao estresse por déficit hídrico, visto que apresentou um maior número de genes induzidos e/ou reprimidos ao longo do tratamento experimental;
- Na cv sensível foram reprimidas ESTs com similaridade a genes de enzimas envolvidas na síntese de osmoprotetores, tais como prolina, hidroxiprolina e GABA e envolvidas na biossíntese de ABA e jasmonatos; na cv tolerante embora nem todas estas ESTs estejam induzidas durante o estresse, esta cultivar pode ter se beneficiado devido a permanência da transcrição destes genes durante o déficit hídrico;
- Na cv tolerante, o menor número de ESTs induzidas similares a genes de enzimas do sistema de defesa antioxidante, poderia ser um indicativo de que o estresse oxidativo está sendo minimizado pela permanência da transcrição de diferentes osmoprotetores, visto que a sensível apresentou indução do sistema antioxidante e repressão da síntese de um eficiente osmoprotetor, tal como a prolina;
- Embora as duas cultivares tenham apresentado alteração na expressão de genes distintos, é preciso considerar que o mecanismo de tolerância não se deve simplesmente a um único gene, visto que, a tolerância é uma característica complexa, com o envolvimento de muitos genes, os quais inclusive podem ou não estar inter-relacionados.



## VII. REFERÊNCIAS

ÁBRAHÁM, E.; RIGÓ, G.; SZÉKELY, G.; NAGY, R.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 363-372, 2003.

ALEX, D.; BACH, T. J.; CHYE, M.-L. Expression of *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase is developmentally regulated and stress-responsive. **The Plant Journal**, v. 22, n. 5, p. 415-426, 2000.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

ARMENGAUD, P.; THIERY, L.; BUHOT, N.; GRENIER-DE MARCH, G.; SAVOURÉ, A. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 442–450, 2004.

ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, v. 82, n. 10, p. 1227-1238, 2002.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J. R. Statist. Soc.**, v. 57, p. 289-300, 1995.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179-194, 2003.

BOLUMAR, T.; SANZ, Y.; ARISTOY, M.-C.; TOLDRÁ, F. Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 01, p. 227–232, 2003.

BOUCHÉ, N.; FROMM, H. GABA in plant: just a metabolite? **Trends in Plant Science Opinion**, v. 9, n. 3, p. 110-115, 2004.

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.

BRAY, E. A. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarrays and differential expression data. **Annals of Botany**, v. 89, p. 803-811, 2002.

BRESSAN, R. A., HASEGAWA, P. M., LOCY, R. D. Fisiologia do estresse. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, Trad. Eliane Romanato Santarém *et al.*, p.613-643, 2004.

BRONER, I.; LAW, R. A. P. Evaluation of a modified atmometer for estimating reference ET. **Irrigation Science**, v. 12, p. 21-26, 1991.

BRUCE, W. B.; EDMEADES, G. O.; BARKER, T. C. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 13-25, 2002.

CAMBRAIA, J. Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas. In: Eds. NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**, p., 95-105, 2005.

CASAGRANDE, E. C.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; PEDROSO, J.; MARTINS, P. K.; BRETON, M. C.; NEPOMUCENO, A. L. Expressão gênica

diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 168-184, 2001.

CHA-UM, S.; SUPAIBULWATANA, K.; KIRDMANEE, C. Water relation, photosynthetic ability and growth of Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica* cv. KDML 105) to salt stress by application of exogenous glycinebetaine and choline. **Journal Agronomy & Crop Science**, v. 192, p. 25-36, 2006.

CHEN, T. H. H., MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 250-257, 2002.

CHEN, Q.; HADDAD, G. G. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 3125-3129, 2004.

CHEONG, Y.H.; CHANG, H-S; GUPTA, R.; WANG, X.; ZHU, T.; LUAN, S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.129, p.661-677, 2002.

CLAUSSEN, W. Proline as a measure of stress in tomato plants. **Plant Science**, v. 168, p. 241-248, 2005.

CORUZZI, G.; LAST, R. Amino acids. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 358-410, 2000.

CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 850-929, 2000.

DENNIS, D. T.; BLAKELEY, S. D. Carbohydrate metabolism. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 630-675, 2000.

DEUSCHLE, K.; FUNCK, D.; FORLANI, G.; STRANSKY, H.; BIEHI, A.; LEISTER, D.; VAN DER GRAAFF, E.; KUNZE, R.; FROMMER, W. B. The role of  $\Delta$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. **Plant Cell**, v. 16, p. 3413-3425, 2004.

FELIX, J. M.; DRUMMOND, R. D.; NOGUEIRA, F. T. S.; ROSA Jr., V. E.; JORGE, R. A.; ARRUDA, P.; MENOSSE, M. Genoma funcional. Uso de arranjos de DNA em náilon para a análise da expressão gênica em larga escala. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 24, p. 60-67, 2002.

FRANÇA, S. C.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M. A.; PUGA, R. D.; RODRIGUES, A.; PEREIRA, J. O. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetic Molecular Biology**, v.24, n.1-4, p.243-250, 2001.

GARG, A. K.; KIM, J.-K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; Y. D.; KOCHIAN, L. V.; WU, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **PNAS**, v. 99, n. 25, p. 15898-15903, 2002.

GENTLEMAN, R. C.; CAREY, V. J.; BATES, D. M.; *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, p. R80.1-R80.16, 2004.

GUAN, L. M.; ZHAO, J.; SCANDALIOS, J. G. Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the likely intermediary signaling molecule for the response. **Plant Journal**, v. 22, n. 2, p. 87-95, 2000.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79-102, 1997.

HE, Y.; FUKUSHIGE, H.; HILDEBRAND, D. F.; GAN, S. Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 128, p. 876–884, 2002.

HERNÁNDEZ, J. A.; JIMÉNEZ, A.; MULLINEAUX, P.; SEVILLA, F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 853-62, 2000.

HERRIG, V.; FERRARESE, M. L. L.; SUZUKI, L. S.; RODRIGUES, J. D.; FERRARESE-FILHO, O. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. **Biological Research**, v. 35, n. 1, p. 59-66, 2002.

HUBER, W.; VON HEYDEBRECK, A.; SULTMANN, H.; POUSTKA, A.; VINGRON, M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. **Bioinformatics**, v. 18, p. S96-S104. 2002.

IHAKA, R.; GENTLEMAN, R. C. R: A language for data analysis and graphics. **J Comput Graph Stat**, v. 5, p. 299-314, 1996.

ISHITANI, M.; MAJUMDER, A. L.; BORNHOUSER, A.; MICHALOWSKI, C. B.; JENSEN, R. G.; BOHNERT, H. J. Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. **The Plant Journal**, v. 9, n. 4, p. 537-548, 1996.

IYER, S.; CAPLAN, A. Products of proline can induce osmotically regulated genes in rice. **Plant Physiology**, v. 116, p. 203-211, 1998.

JAIN, A. K.; VINCENT, R. M.; NESSLER, C. L. Molecular characterization of a hydroxymethylglutaryl-CoA reductase gene from mulberry (*Morus alba* L.). **Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 559-569, 2000.

JIANG M, AND ZHANG J. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of

antioxidant enzymes in maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 379, p. 2401-2410, 2002.

KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.

KHADRI, M.; PLIEGO, L.; SOUSSI, M.; LLUCH, C.; OCAÑA, A. Ammonium assimilation and ureide metabolism in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. **Agronomie**, v. 21, p. 635–643, 2001.

KOSMAS, S. A.; ARGYROKASTRITIS, A.; LOUKAS, M. G.; ELIOPOULOS, E.; TSAKAS, S.; KALTSIKES, P. J. Isolation and characterization of drought-related trehalose-6-phosphate-synthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Planta**, v. 223, p. 329-339, 2006.

KOTCHONI, S. O.; BARTELS, D. Water stress induces the up-regulation of a specific set of genes in plants: aldehyde dehydrogenases as an example. **Bulgarian Journal of Plant Physiology.**, Special Issue, p. 37–51, 2003.

KWON, S. Y.; JEONG, Y. J.; LEE, H. S.; KIM, J. S.; CHO, K. Y.; ALLEN, R. D.; KWAK, S. S. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 873-882.

LARCHER, W. A Planta sob Estresse. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa Artes e Textos, p.341-478, 2004.

LIU, X.; BAIRD, W. V. Differential expression of genes regulated in response to drought or salinity stress in sunflower. **Crop Science**, v. 43, p. 678–687, 2003.

MAGGIO, A.; MIYAZAKI, S.; VERONESE, P.; FUJITA, T.; IBEAS, J. I.; DAMSZ, B.; NARASIMHAN, M. L.; HASEGAWA, P. M.; JOLY, R. J.; BRESSAN, R. A. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **The Plant Journal**, v. 31, n. 6, p. 699-712, 2002.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. Respiração. In: **Fisiologia Vegetal. Fotossíntese, Respiração, Relações hídricas e Nutrição mineral**. Viçosa: UFV, p. 107-164, 2005.

NAYYAR, H. Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. **Environmental and Experimental Botany**, v. 50, p. 253-264, 2003.

NEPOMUCENO, A. L.; STEWART, J. M.; OOSTERHUIS, D. M.; TURLEY, R.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B. Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n. 7, p. 1407-1416, 2000.

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.

NOGUEIRA, F. T. S.; ROSA Jr, V. E.; MENOSSI, M.; ULIAN, E. C.; ARRUDA, P. RNA Expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1811-1824, 2003.

OBBER, E. S. & LUTERBACHER, M. C. Genotypic variation for drought tolerance in *Beta vulgaris*. **Annals of Botany**, v. 89, p. 917-924, 2002.

ODA, A.; SHIMIZUA, M.; KUROHA, T.; SATOH, S. Induction of xylem sap methylglycine by a drought and rewatering treatment and its inhibitory effects on the growth and development of plant organs. **Physiologia Plantarum**, v. 124, p. 515-523, 2005.

ORLANDO FILHO, J.; MACEDO, N.; TOKESHI, H. Seja o Doutor do seu Canavial. **ARQUIVO DO AGRÔNOMO Nº6** – Encarte: **INFORMAÇÕES AGRÔMICAS**, n. 67, p. 1-17, 1994.

OZTURK Z. N., TALAMÉ V., DEYHOLOS M., MICHALOWSKI, C. B.; GALBRAITH, D. W.; GOZUKIRMIZI, N.; TUBEROSA, R.; BOHNERT, H. J. Monitoring large-scale in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 551-573, 2002.

PELAH, D.; WANG, W.; ALTMAN, A. *et al.* Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 99, p. 153-159, 1997.

PIMENTEL, C.; HÉBERT, G. Potencial fotossintético e condutância estomática em espécies de feijão caupi sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11(1), p. 7-11, 1999.

QIANG, L.; NANMING, Z.; YAMAGUCH-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. **Chinese Science Bulletin**, v. 45, n. 11, p. 970-975, 2000.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 2005. ISBN 3-900051-07-0 <http://www.R-project.org>.

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.

RAYMOND, M. J.; SMIRNOFF, N. Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential. **Annals of Botany**, v. 89, p. 813-823, 2002.



REYMOND, P.; WEBER, H.; DAMOND, M.; FARMER, E. E. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 12, p. 707–719, 2000.

REYMOND, P., FARMER, E. E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, p. 404-411, 1998.

RICCARDI, F.; GAZEAU, P.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. **Plant Physiology**, v. 117, p. 1253–1263, 1998.

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

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

SAIRAM, R. K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, v. 86, n. 3, p. 407-421, 2004.

SALASSIER, B. **Manual de Irrigação**. 6<sup>a</sup> ed. Viçosa: UFV Imprensa Universitária, 1995. 657p.

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

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2(3), p. 287-294, 1998.

SCHLUEPMANN, H.; VAN DIJKEN, A.; AGHDASI, M.; WOBES, B.; PAUL, M.; SMEEKENS, S. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. **Plant Physiology**, v. 135, p. 879–890, 2004.

SCHUMMER, M.; WAILAP, V. N. G.; BUMGARNER, R. E.; NELSON, P. S.; SCHUMMER, B.; BEDNARSKI, D. W.; HASSELL, L.; BALDWIN, R. L.; KARLAN, B. Y.; HOOD, L. Comparative hybridization of an array of 21.500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. **Gene**, v. 238, p. 375-385, 1999.

SERRANO, R.; MONTESINOS, C. Molecular bases of desiccation tolerance in plant cells and potential applications in food dehydration. **Food Sci Tech Int**, v. 9, n. 3, p. 157–161, 2003.

SHARMA, S. S.; DIETZ, K.-J. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 4, p. 711–726, 2006.

SHELP, B. J.; BOWN, A. W.; MCLEAN, M. D. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. **Trends in Plant Science Reviews**, v. 4, n. 11, p. 446-452, 1999.

SMYTH, G. K. Limma: linear models for microarray data. In: GENTLEMAN, R. C.; CAREY, V. J.; DUDOIT, S.; IRIZARRY, R.; HUBER, W. (eds.). **Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor**, Springer, New York, p. 397-420, 2005.

SOARES NETTO, L. E. Oxidative stress response in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24 n. 1-4, p. 93-102, 2001.

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

STEFANUTO, V. A. **Efeito do cálcio na homeostase de brotações de um clone de *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) sob condições de deficiência hídrica induzida *in vitro***. 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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

TAYLOR, C. B. Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1221-1224, 1996.

VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J.-K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v. 45, p. 523–539, 2006.

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.

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.

VINCENT, D.; LAPIERRE, C.; POLLET, B.; CORNIC, G.; NEGRONI, L.; ZIVY, M. Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. **Plant Physiology**, v. 137, p. 949–960, 2005.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. In: Eds. NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**, p. 118-126, 2005.

WINGLER, A.; FRITZIUS, T.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T.; AESCHBACHER, R. A. Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 124, p. 105–114, 2000.

WOOD, A. J.; SANEOKA, H.; RHODES, D.; JOLY, R. J.; GOLDSBROUGH, P. B. Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. Molecular cloning and expression of two related genes. **Plant Physiology**, v. 110, p. 1301-1308, 1996.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J-K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **The Plant Cell**, Supplement, p. S165-S183, 2002.

XIONG, L.; ZHU, J-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 131-139, 2002.

YORDANOV, I; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought and stress tolerance. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Special Issue, p. 187–206, 2003.

ZHAO, J.; WILLIAMS, C. C.; LAST, R. L. Induction of *Arabidopsis* tryptophan pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress, and an abiotic elicitor. **The Plant Cell**, v. 10, p. 359–370, 1998.

#### **Referências de Web Site:**

<http://apps.fao.org>; FAOSTAT Home Page.

<http://sucest.lad.ic.unicamp.br/public>; SUCEST Home Page.

<http://www.tree.caltech.edu/protocols/overgo.html>; WASHINGTON UNIVERSITY Home Page.

[www.bioconductor.org/](http://www.bioconductor.org/); BIOCONDUCTOR Home Page.

## APÊNDICE: Reagentes e Soluções

- **Solução Nutritiva de *Hoagland* 25%:**

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M (1,0 mL/L);
- $\text{KNO}_3$  1M (5,0 mL/L);
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1M (5,0 mL/L);
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1M (2,0 mL/L);
- Fe. EDTA 1M (1,0 mL/L); e
- 1,0 mL/L de solução de micronutrientes.

- **Solução de Micronutrientes:**

- $\text{H}_3\text{BO}_3$  (2,86g/L);
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1,81g/L);
- $\text{ZnCl}_2$  (0,10g/L);
- $\text{CuCl}_2$  (0.04g/L);
- $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.02g/L).

- **Tampão de Amostra:**

- 750 $\mu\text{L}$  formamida;
- 150 $\mu\text{L}$  de tampão de corrida 10x;
- 90 $\mu\text{L}$  formaldeído;
- pitada azul de bromofenol;
- q.s.p. 1.125 mL com água-DEPC.

- **Solução de Lise:**

- 200mM de NaOH;
- 1% de SDS.

- **Solução de Pré-Hibridação e Hibridação:**

- 1,0 % (p/v) de BSA (Fraction V, Sigma);
- 7,0 % de SDS (99,9%);
- 0,5 M de tampão fosfato de sódio pH 7,0; e
- 1,0 mM de EDTA.