

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

**PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, ACÚMULO DE PROLINA  
E IDENTIFICAÇÃO DE RESPOSTAS MOLECULARES,  
POR cDNA-AFLP, AO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO  
EM CANA-DE-AÇÚCAR**

**Daniele Fernanda Jovino Gimenez  
Bióloga**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**

**Dezembro – 2011**

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

**PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, ACÚMULO DE PROLINA  
E IDENTIFICAÇÃO DE RESPOSTAS MOLECULARES,  
POR cDNA-AFLP, AO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO  
EM CANA-DE-AÇÚCAR**

**Daniele Fernanda Jovino Gimenez**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro**

**Coorientador: Prof. Dr. Miguel Ângelo Mutton**

**Coorientadora: Dra. Karina Maia Dabbas**

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro - 2011

G491p Gimenez, Daniele Fernanda Jovino  
Parâmetros biométricos, acúmulo de prolina e identificação de respostas moleculares, por cDNA-AFLP, ao estresse por déficit hídrico em cana-de-açúcar./ Daniele Fernanda Jovino Gimenez. -- Jaboticabal, 2011  
v, 106 f. ; il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro

Banca examinadora: Flavia Maria de Souza Carvalho, Janete Aparecida Desiderio, Roberto Willians Noda, André Luiz Julien Ferraz  
Bibliografia

1. cDNA-AFLP. 2. Deficiência hídrica. 3. *Saccharum* spp. 4. Expressão gênica diferencial. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61:632.112

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**

**DANIELE FERNANDA JOVINO GIMENEZ** – nascida em 15 de agosto de 1981, no município de Jundiaí - SP, filha de José Osnei Jovino e Vera Lúcia Revoredo Jovino. Bióloga, graduada em Bacharelado e Licenciatura pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, em dezembro de 2003. Em março de 2005 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), obtendo o título de mestre em julho de 2007 e em agosto do mesmo ano, iniciou o curso de doutorado vinculado ao mesmo programa de pós-graduação citado.

*A Deus, pela vida, pela saúde e pela oportunidade em estudar e concluir mais essa etapa da minha vida.*

*Aos meus pais **JOSÉ OSNEI** e **VERA LUCIA** (in memoriam), por todos os ensinamentos, amor, apoio, carinho, compreensão durante toda a minha vida. Obrigada por tudo. Amo vocês.*

*Aos meus irmãos **CARLA** e **RODRIGO**, pelo carinho, amizade, apoio e pela ajuda em cuidar do Arthur. Amo vocês.*

*Aos meus sogros e cunhada, **Nelson**, **Maria Inês** e **Angélica**, pelo apoio, carinho, incentivo e pela grande ajuda em cuidar do Arthur.  
Amo Vocês.*

*Ao meu esposo **NELSON**, pelo amor, compreensão e afeto. Te amo!!!  
E ao meu filho, meu anjinho **ARTHUR**, por proporcionar um novo sentido em minha vida. Te amo!!!!*

*DEDICO*

## *Mãe*

*Você foi um exemplo de mulher, amiga, filha, esposa, e  
principalmente a Melhor Mãe do mundo!!!!!!*

*Amor Eterno!*

## *Para Sempre*

*Por que Deus permite que as mães vão-se embora?  
Mãe não tem limite, é tempo sem hora, luz que não apaga  
quando sopra o vento e chuva desaba, veludo escondido  
na pele enrugada, água pura, ar puro, puro pensamento.*

*Mãe, na sua graça, é eternidade.  
Por que Deus se lembra - mistério profundo - de tirá-la um dia?  
Fosse eu Rei do Mundo, baixava uma lei:  
Mãe não morre nunca, mãe ficará sempre junto de seu filho e ele,  
velho embora, será pequenino feito grão de milho.*

*Carlos Drummond de Andrade*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa Dra Maria Inês Tiraboschi Ferro** por novamente acreditar em mim, pelas orientações ao longo desses anos, incentivos e paciência nessa nova fase profissional e pessoal da minha vida.

Ao **Prof Dr Jesus Aparecido Ferro** pela oportunidade de crescimento, pelos ensinamentos e acima de tudo pela confiança.

A **Dra Karina Maia Dabbas**, pelas orientações nos experimentos em bancada e acima de tudo, pela confiança e carinho conquistados em todos esses anos. Muito obrigada queria amiga e futura mamãe. Te adoro Ká.

A **Prof Dr Miguel Angelo Mutton**, pelas orientações na condução do experimento em casa de vegetação e com os resultados obtidos.

Aos amigos e companheiros de trabalho em casa de vegetação: **Juliana Vantini, Gi Dedemo, Arthur Rossini, Osmar e Tião**, pelo trabalho realizado, pelos ensinamentos e principalmente pelos momentos de alegria durante toda a condução experimental.

As queridas amigas **Gisele C. Dedemo** e **Juliana Vantini**, pela amizade, ensinamentos, desabafos, apoio, críticas, momentos de alegria e consolo. Amo vocês.

Às pesquisadoras **Dra Luciana Rossini Pinto** e **Dra Silvana Aparecida Creste Dias de Souza** do Centro de Cana-de-Açúcar (IAC/Ribeirão Preto, S.P., Brasil) pela disponibilidade da utilização do laboratório para a realização dos experimentos de cDNA-AFLP. Agradeço, em especial, a aluna de mestrado **Bruna**, por disponibilizar seu precioso tempo em ensinar e preparar os géis de poliacrilamida, eletroforese vertical e coloração por prata.

Ao **Fabício**, pela amizade e pelos ensinamentos e auxílio durante a realização do experimento de cDNA-AFLP.

Ao **Prof Dr Dilermando Perecin** e o **Dr Alan R. Panosso**, pela realização das análises estatísticas, indispensáveis para a interpretação dos dados.

Ao meu primo **Julinho, Flávia e Ana** pelos ensinamentos, carinho e pelo preparo das células de *E. coli*, quimiocompetentes.

A minha nova amiga **Ana Carolina**, pela grande ajuda com a prolina e principalmente por ser tão especial. Te adoro.

A minha amiga **Mariza**, pela ajuda com as placas de sequenciamento, pesagem das amostras e principalmente pelo carinho e apoio. Te adoro.

A minha grande amiga **Maria Angela Coelho (Angel)**, pela amizade, apoio, carinho, confiança, afeto e um ombro amigo em todos os momentos... Amo você!

A minha amiga **Renata**, pelas conversas, pela ajuda na interpretação dos resultados, no auxílio com a tese, e em passar o domingo imprimindo a tese. Te adoro.

Aos meus amigos do LBM e CREBIO: Agda, Elaine, Mônica, Flavinha, Ju "Gosminha", Andréia, Rafael, Juliana De Antonio, Aline, Lúcia, Mayara, Lucília, Mariana, Gustavo, Gustavo Squassoni, Rafael Kuradomi, Raquel e ao Cedral, pelos ensinamentos e momentos de alegria.

À UNESP/Jaboticabal, ao coordenador **Prof Dr Rinaldo C. de Paula** e demais professores do Programa de Pós-Graduação (Genética e Melhoramento de Plantas) pela importante contribuição no aperfeiçoamento de minha formação acadêmica.

Aos doutores componentes da banca de qualificação: **Dra Karina M. Dabbas, Dra Flavia M. de Souza Carvalho, Dra Poliana F. Giachetto, Prof Dr Rinaldo C. de Paula e a Dra Luciana Rossini**, pelas correções e sugestões aplicadas no exame de qualificação.

Aos doutores componentes da comissão examinadora: **Dra Karina M. Dabbas, Dra Flavia M. de Souza Carvalho, Profa Dra Janete A. Desiderio, Prof Dr André Luiz Julien Ferraz e o Dr Roberto W. Noda**, pelas correções e sugestões visando o aperfeiçoamento deste trabalho.

A **todos os funcionários do Departamento de Tecnologia** pela amizade.

Ao auxílio financeiro da **CAPES** pela bolsa de doutorado.

**A todos os meus sinceros agradecimentos.**

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO.....</b>	<b>iii</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>v</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>III. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
3.1. A CANA-DE-AÇÚCAR.....	4
3.2. IMPORTÂNCIA SÓCIO-ECONÔMICA.....	5
3.3. ESTRESSE AMBIENTAL.....	6
3.4. RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO.....	8
3.5. TÉCNICA DE CDNA-AFLP.....	10
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
4.1. LOCAL DA REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	13
4.2. MATERIAL VEGETAL.....	13
4.3. TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	14
4.4. CÁLCULO PARA A DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DO SOLO.....	16
4.5. CONDIÇÕES AMBIENTAIS NO INTERIOR DA CASA DE VEGETAÇÃO.....	17
4.6. COLETA DOS PALMITOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	17
4.7. AVALIAÇÕES BIOMÉTRICAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	17
4.7.1. ALTURA INICIAL E FINAL DAS PLANTAS.....	18
4.7.2. NÚMERO DE FOLHAS.....	18
4.7.3. DIÂMETRO DO COLMO.....	18
4.7.4. MATÉRIA FRESCA DE FOLHAS, BAINHAS E COLMOS.....	18
4.7.5. MATÉRIA SECA DE FOLHAS, BAINHAS E COLMOS.....	19
4.8. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROLINA LIVRE.....	19
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
4.10. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	20
4.10.1 QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL.....	20
4.10.2. ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO RNA TOTAL EM GEL DE AGAROSE DESNATURANTE.....	21
4.11. SÍNTESE DA 1ª FITA DO CDNA.....	21
4.11.1. PROCEDIMENTO PARA A SÍNTESE DA 2ª FITA DO CDNA.....	22
4.11.2. PURIFICAÇÃO DO CDNA POR MEIO DA EXTRAÇÃO COM FENOL/CLOROFÓRMIO .....	22
4.12. TÉCNICA DE CDNA-AFLP.....	23

4.12.1. REAÇÃO DE RESTRIÇÃO .....	23
4.12.2. REAÇÃO DE LIGAÇÃO DOS PARES DE ADAPTADORES .....	24
4.12.3. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO PRÉ-SELETIVA .....	25
4.12.4. TESTE DAS COMBINAÇÕES DE INICIADORES .....	25
4.12.5. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO SELETIVA.....	28
4.13. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 6% CORADO COM NITRATO DE PRATA.....	30
4.14. VISUALIZAÇÃO, RECUPERAÇÃO E REAMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS.....	32
4.15. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR REFERENTES AOS FES-T .....	33
4.16. CLONAGEM DOS FES-T .....	33
4.17. TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA DOS FES-T.....	34
4.18. PREPARAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL.....	34
4.19. SEQUENCIAMENTO DOS FES-T .....	35
4.20. ANÁLISE DOS FES-T .....	36
<b>V. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
5.1. ESCOLHA DO MATERIAL VEGETAL (PALMITO).....	37
5.2. DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DO SOLO .....	38
5.3. CONDIÇÕES AMBIENTAIS NO INTERIOR DA CASA DE VEGETAÇÃO .....	38
5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO .....	40
5.4.1 ALTURA INICIAL E FINAL DA PLANTA (AIP E AFP) .....	43
5.4.2. NÚMERO DE FOLHAS (NF).....	50
5.4.3. DIÂMETRO DO COLMO (DC) .....	53
5.4.4. MATÉRIA FRESCA DE FOLHAS, BAINHAS E COLMOS (MFFB – MFC).....	54
5.4.5. MATÉRIA SECA DE FOLHAS, BAINHAS E COLMOS (MSFB – MSC) .....	56
5.5. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROLINA LIVRE.....	58
5.6. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE PALMITOS DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	62
5.6.1. INTEGRIDADE E PUREZA DO RNA.....	62
5.7. TÉCNICA DE CDNA-AFLP .....	64
5.7.1. IDENTIFICAÇÃO E RECUPERAÇÃO DOS FRAGMENTOS EXPRESSOS.....	64
5.7.2. RE-AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS EXCLUSIVOS NAS CULTIVARES TOLERANTES (FES-T). .....	71
5.7.3 ANÁLISE DOS FRAGMENTOS EXPRESSOS EXCLUSIVAMENTE NAS CULTIVARES TOLERANTES (FES-T). .....	72
<b>VI. CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>

**PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, ACÚMULO DE PROLINA E IDENTIFICAÇÃO DE RESPOSTAS MOLECULARES, POR cDNA-AFLP, AO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO EM CANA-DE-AÇÚCAR**

**RESUMO** - A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das mais importantes culturas e o Brasil é considerado o maior produtor mundial de etanol. Entretanto, sua produção é diretamente influenciada pelos estresses ambientais, entre eles, o déficit hídrico. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento, por meio de análises biométricas e bioquímica de três cultivares de cana-de-açúcar tolerantes (SP83-5073 e RB86-7515) e sensível (SP86-155) ao estresse por déficit hídrico, e verificar a expressão gênica diferencial dependente do genótipo, utilizando a técnica de cDNA-AFLP. Aos 186 dias após o plantio, em casa de vegetação, as cultivares foram submetidas a 1, 3, 5 e 10 dias de supressão da rega. Foi verificado na cultivar RB86-7515 o maior diâmetro do colmo, matéria fresca e seca de folhas e bainha e na cultivar SP86-155, maior altura inicial, número de folhas e matéria fresca de colmo. O teor de prolina livre nos palmitos foi estatisticamente significativo a partir do terceiro dia de supressão da rega, onde foi verificada a maior média na cultivar RB86-7515, com 10 dias. Pela técnica de cDNA-AFLP, foram detectados fragmentos expressos (FEs), identificados pela ausência do fragmento na cultivar sensível e fragmentos exclusivos expressos nas cultivares tolerantes (FEs-T) mas desde que ausentes em suas planta controle. Com 10 combinações de *primers* seletivos EcoRI/MseI, em gel de poliacrilamida, foram observados 1.077 fragmentos expressos nas cultivares tolerantes controle e sob estresse hídrico. Destes, 463 fragmentos na SP83-5073, sendo 170 fragmentos nas plantas sob estresse hídrico e 18 fragmentos exclusivos. Na RB86-7515, observou-se 614 fragmentos, onde 283 fragmentos nas plantas sob supressão da rega e 30 fragmentos exclusivos. A análise comparativa do perfil de expressão revelou fragmentos de transcritos similares a Citocromo P450 de sorgo, beta-glucosidase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e DNA Helicase. Esses genes, provavelmente, atuam

como reguladores do crescimento de plantas, mediador de respostas metabólicas e resistência a estresse abiótico.

**Palavras-Chave:** cDNA-AFLP, deficiência hídrica, expressão gênica diferencial, prolina, *Saccharum* spp.

## BIOMETRIC PARAMETERS, PROLINE ACCUMULATION AND IDENTIFICATION OF MOLECULAR RESPONSES, BY cDNA-AFLP, TO WATER STRESS IN SUGARCANE

**SUMMARY** – Sugarcane (*Saccharum* spp.) is one of the most important crops and Brazil is the largest world producer of ethanol. However, their production is directly influenced to environmental stresses, as a water stress. So, the aims of this research were to evaluate the behavior of three sugarcane tolerant cultivars (SP83-5073 e RB86-7515) and sensitive (SP86-155) to water stress by biometrical and biochemical analysis, and verified the differential gene expression genotype dependent, using the cDNA-AFLP technique. At 186 days after planting, in greenhouse, cultivars were submitted to 1, 3, 5 and 10 days of water suppression. In cultivar RB86-7515, were observed the largest stalk diameter, leaves and sheath fresh and dried weigh and in cultivar SP86-155, largest initial height, leaves number and stalk fresh mass. Free proline content in sugarcane heart was statistically significative after the 3<sup>rd</sup> day of water suppression, which the large media was observed in cultivar RB86-7515, with 10 days of water suppression. Through cDNA-AFLP technique, expressed fragments were detected, identified by the fragment absence in sensitive cultivar, and exclusive fragments were expressed in tolerant cultivars, but absent in control plants. Using 10 combinations of selective *primers* EcoRI/MseI, in poliacrilamide gel, 1,077 expressed fragments in control tolerant cultivars and under water stress were observed. From this total, 463 fragments in SP83-5073, 170 fragments in water-stressed plants and 18 exclusive fragments. In RB86-7515, 614 fragments were observed, 283 fragments in plants under water suppression and 30 exclusive fragments. Profile expression comparative analysis showed fragments of similar transcriptions to sorghum P450 Citocrome, beta-glucosidase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and DNA Helicase. These genes, probably act as a plant regulator growth, metabolic responses mediator and resistance to abiotic stress.

**Key words:** cDNA-AFLP, water deficiency, differential gene expression, proline, *Saccharum* spp.

## I.INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea alógama e semi-perene, pertencente à família Poaceae e ao gênero *Saccharum* (DANIELS & ROACH, 1987). É uma importante cultura pertencente a regiões tropicais e subtropicais, sendo plantada em cerca de 20 milhões de hectares no mundo (MENOSSI et al. 2008) e em mais de 90 países. Desde os tempos do Brasil colônia até os dias atuais, a cultura da cana-de-açúcar tem sido uma grande fonte de riqueza para a economia brasileira (SACILOTO, 2003) e o aumento da importância da cultura se deve a vários fatores sociais, econômicos e ambientais, sendo a alta no preço do petróleo e o aquecimento global um dos principais (NASSIF, 2010).

Esta cultura se encontra em plena expansão no Brasil e em outras partes do mundo (FERRO, 2008), porém sua produção pode ser acometida pelos estresses ambientais, como por exemplo, a ampliação dos períodos de seca, ocasionado pelo aquecimento global, que influencia diretamente na disponibilidade de água do solo em canaviais, reduzindo significativamente os rendimentos agrícolas (MAULE et al., 2001). A baixa disponibilidade hídrica afeta negativamente o crescimento dos cultivos agrícolas e é a principal causa da redução da produtividade (PIMENTEL, 2004; FLEXAS et al., 2006).

Os efeitos da falta d'água nas plantas incluem diminuição no tamanho das células foliares, diminuição do potencial de água na planta e redução nas taxas de assimilação de CO<sub>2</sub>, crescimento, transpiração e abertura estomática (HSIAO, 1973; TAIZ & ZEIGER, 2004; SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

As plantas expostas à deficiência hídrica alteram seu metabolismo por meio da ativação de diferentes mecanismos de resistência, a fim de se adaptarem a esse tipo de estresse (ASHRAF & FOOLAD, 2007). Genes induzidos em condições de estresse hídrico, não agem apenas protegendo as células do déficit de água através da produção de importantes proteínas, mas também participam da regulação dos genes de transdução de sinal (SHINOZAKI et al., 2003). Devido

à importância da cana-de-açúcar, o entendimento destes mecanismos de tolerância aos estresses contribuirá significativamente para indicar o melhor manejo visando obter maior produtividade agrícola (KAVI KISHOR et al., 2005).

Para a análise da expressão de genes, sem o seu conhecimento prévio, existem várias metodologias que são utilizadas, podendo-se destacar técnicas de sequenciamento de Etiquetas de Seqüências Expressas (ESTs) (ADAMS et al., 1991), *Differential Display* (DD) (LIANG & PARDEE, 1992), *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) (VELCULESCU et al., 1995) e *Supression Subtractive Hybridization* (SSH) (DIATCHENKO et al., 1996).

A técnica de cDNA-AFLP é uma melhoria da técnica tradicional de *Differential Display* (BACHEM et al., 1996, ALBA et al., 2004), também baseada na técnica de AFLP (VOS et al. 1995) mas com a utilização de cDNA. Esta técnica é baseada na amplificação seletiva por PCR de fragmentos de cDNA ligados a adaptadores (BACHEM et al., 1998) e oferece diversas vantagens sobre outros métodos de análise de expressão gênica (BACHEM et al., 1996), onde permite a análise a partir de uma pequena quantidade de amostras e a detecção de pequenas diferenças de expressão, tendo como sua maior limitação alta ocorrência de falsos positivos, que pode ser minimizada pelo uso de repetições técnicas e biológicas (STEIN & LIANG, 2002).

Portanto, no presente trabalho foi realizada, por meio da técnica de cDNA-AFLP, para a análise comparativa do perfil de expressão gênica de genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para a tolerância à seca, permitindo a detecção de genes-candidatos ao caráter de tolerância. Avaliações biométricas e bioquímicas também foram realizadas com a finalidade de ampliar a compreensão dos mecanismos de tolerância da cultura à deficiência hídrica.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar, por meio da técnica de cDNA-AFLP, as respostas moleculares relacionadas à tolerância ao estresse por déficit hídrico em cana-de-açúcar através da comparação de três cultivares de comportamentos contrastantes, sendo tolerantes à seca (SP83-5073 e RB86-7515) e sensível (SP86-155).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar avaliações biométricas das três cultivares de cana-de-açúcar, mantidas sob déficit hídrico por diferentes períodos: 1, 3, 5 e 10 dias;
- Análise bioquímica do osmoprotetor prolina no palmito das diferentes variedades ao longo do período de estresse hídrico;
- Identificar, pela técnica de cDNA-AFLP, fragmento(s) de cDNA diferencialmente expresso(s) nas cultivares de cana-de-açúcar tolerantes ao déficit hídrico (SP83-5073 e RB86-7515) por meio da comparação com a cultivar sensível (SP86-155);
- Clonar e sequenciar os Fragmentos Exclusivos expressos nas cultivares Tolerantes (FEs-T) e ausente nas plantas controle;
- Determinar as proteínas e as funções correspondentes aos FEs-T através de análises *in silico*, utilizando ferramentas de bioinformática para a pesquisa de similaridade de sequência contra os bancos de dados públicos não redundantes de proteínas e de nucleotídeos.

### III. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Cyperales, família Poaceae, tribo Andropogoneae, subtribo Saccharinae e gênero *Saccharum*, de acordo com a classificação botânica descrita por Cronquist em 1981 (SCARPARI & BEAUCLAIR, 2008). A família Poaceae é conhecida como a família das gramíneas, tais como cereais, milho, trigo, arroz e sorgo entre outras culturas forrageiras (TZVELEV, 1989). É originária do Sudeste Asiático, na grande região central da Nova Guiné e Indonésia, onde seis espécies de *Saccharum* são reconhecidas: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barbieri* e *S. edule*. Deste modo, a cultura da cana-de-açúcar, no Brasil e no mundo, é constituída por híbridos provenientes do cruzamento de hibridização natural entre as espécies *S. officinarum* e *S. barbieri* (DANIELS & ROACH, 1987). De acordo com SREENIVASA et al. (1987), *S. officinarum* possui caráter poliplóide (ter mais que dois conjuntos cromossômicos), no caso, octaploidia ( $2n = 80$  – oito conjunto completo de cromossomos), por essa razão, esse gênero é considerado híbridos complexos de diferentes espécies, que possui dois ou mais conjuntos cromossômicos diferentes.

A propagação da cana-de-açúcar é realizada vegetativamente por brotação das gemas presentes no colmo (GASCHO & SHIH, 1983). A planta produz muitos perfilhos em seu desenvolvimento inicial, constituídos por diversos nós separados por entrenós os quais são responsáveis pelo armazenamento da sacarose, porém a ação de vários fatores pode promover a inibição e/ou favorecimento do desenvolvimento da planta (OLIVEIRA et al., 2004). A cana-de-açúcar é muito cultivada em países tropicais e subtropicais, onde as alternâncias das estações úmidas e secas favorecem o acúmulo de sacarose no colmo (BORTOLAZZO, 2011).

De acordo com RODRIGUES (1995), as características varietais da cana-de-açúcar é que definem o número de colmos por planta, a altura e o diâmetro do colmo, o comprimento, a largura das folhas e a arquitetura da parte aérea e a expressão desses

caracteres é muito influenciada pelo clima, manejo e pelas práticas culturais. GASCHO (1985) relata que a duração dos diferentes estádios de desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar é compreendida pela germinação e emergência (1 mês), brotação e estabelecimento do dossel (2 meses), grande crescimento (7 meses) e a maturação ou amadurecimento (2 meses).

### **3.2. Importância Sócio-Econômica**

Desde os tempos do Brasil colônia até os dias atuais, a cultura da cana-de-açúcar tem sido uma grande fonte de riqueza para a economia brasileira (SACILOTO, 2003). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido por Índia, Tailândia e Austrália. Para a safra de 2010/2011, a área de cana-de-açúcar colhida, destinada à atividade sucroalcooleira está estimada em 8.033,6 mil hectares, distribuída em todos os estados produtores, pode ser 16,93% maior em comparação com a safra anterior e esse aumento é observado na região norte (52,59%), no nordeste (9,39%), no centro-oeste (48,07%), no sudeste (13,98%) e no sul (25,91%). E, do total da produção de cana-de-açúcar, 336.276,1 mil toneladas (53,8%) serão destinadas à produção de etanol, gerando um volume total de 27.669,55 milhões de litros (CONAB, 2011).

Desta maneira, o Brasil é considerado o maior produtor mundial de açúcar e álcool com uma produção contínua ao longo do ano tornando-se assim responsável pelo abastecimento do mercado interno e externo (BARBIERI, 2005). Além disso, destaca-se, também, na produção de outros produtos e subprodutos de relevante importância econômica (FILHO, 2009), tais como a produção de papel e de plásticos biodegradáveis, de açúcares não calóricos, de compostos químicos de interesse farmacêutico, de produtos para a indústria etanol-química e para a alimentação suplementar dos ruminantes no período de estiagem (DINIZ, 2007; MARTINS, 2004; SACILOTO, 2003).

Devido a grande demanda por veículos bicombustíveis e por combustíveis renováveis (NÓBREGAS & DORNELAS, 2006), ocasionado pela preocupação mundial com o ambiente, vários países buscam a substituição do combustível fóssil por outros

combustíveis menos poluentes (MAULE et al., 2001), no caso, o etanol, um biocombustível renovável (MENOSSI et al., 2008). Por essa razão, o Brasil é considerado um país modelo no desenvolvimento e uso comercial da cana como biocombustível, assim como, na geração de energia elétrica a partir da sua biomassa (LUO et al., 2009). Segundo FERRO (2008), a cana-de-açúcar é uma alternativa ao uso do petróleo, devido à produção de energia renovável como também pela capacidade de fornecer carbono fixado pelas plantas (fonte renovável) para a síntese de compostos que serão processados pela indústria química em substituição ao uso do carbono fóssil. Sendo assim, a perspectiva é que a cana-de-açúcar continuará a expandir sua produção, principalmente para a geração de energia limpa (MANNERS & CASU, 2011).

### **3.3. Estresse Ambiental**

As plantas frequentemente estão expostas a fatores ambientais, ocasionando condições de estresse que afetam negativamente seu crescimento, metabolismo e produtividade. Entre os fatores, podemos destacar o excesso de água ou seca, salinidade do solo, calor ou frio intenso, baixa disponibilidade de nutrientes no solo e pouca ou intensa luminosidade (LAWLOR, 2002; RECCHIA, 2011).

Um dos fatores ambientais de maior importância é a deficiência hídrica, pois a produtividade das culturas depende diretamente da quantidade de água disponível e da eficiência do seu uso pelas plantas. O estresse por déficit hídrico proporciona uma diminuição do potencial hídrico do solo, interferindo diretamente na eficiência do uso da água pelas plantas, onde desenvolverá 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) e, conseqüentemente, irá limitar o desenvolvimento das plantas e, por conseguinte, sua produtividade e distribuição (BARTELS & SUNKAR, 2005; CORREIA & NOGUEIRA, 2004).

Os vegetais são constituídos de 85% a 95% de água e em condições de estresse hídrico podem resultar em alterações fisiológicas e bioquímicas (NEUMAIER & NEPOMUCENO, 1994). De acordo com LARCHER (2004), o estresse sofrido pelas plantas, ocasiona um desvio das condições ótimas e induz mudanças e respostas em

todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis, a princípio, mas podem se tornar permanentes.

Um dos principais efeitos da restrição hídrica sobre as plantas é a interrupção do crescimento, devido à inibição da alongação da folha e do caule quando o potencial hídrico decresce, sendo esse efeito diferente entre as espécies (Da SILVA et al., 2001). Desta maneira, a planta mantém seus carboidratos que dão sustentação ao metabolismo e conseqüentemente, irão suprir a energia necessária para obter uma melhor recuperação após o estresse (OSÓRIO et al., 1998). Por essa razão, a deficiência hídrica dos solos gera grandes prejuízos socioeconômicos em áreas semiáridas cultivadas pelo mundo (MUNNS, 2002).

A cana-de-açúcar, sob condições de déficit hídrico, atinge o estágio de maturação, dando início a um processo de acúmulo de sacarose (MARIN et al., 2009) que também pode variar com a época de colheita, idade da planta, temperatura e nitrogênio (SINGELS et al., 2005). Essa característica de estocar sacarose em seus entrenós é uma importante fonte de informação sobre a síntese de sacarose, seu transporte e acúmulo. Toda essa informação torna-se alvos para o melhoramento dirigido das cultivares de cana-de-açúcar (MOORE, 2005).

De acordo com OLIVA et al. (1989), o déficit hídrico afeta o crescimento das plantas devido ao fechamento dos estômatos. Esse processo bloqueia o influxo de CO<sub>2</sub> para as folhas, diminuindo o acúmulo de fotoassimilados, que por conseqüência, irá influenciar indiretamente na absorção de nutrientes atingindo diretamente a produção de açúcar. SANTOS (2005) verificou que a cana-de-açúcar tem variações no consumo de água em função do ciclo da cultura (cana-planta ou soca), do ciclo fenológico (estádio de desenvolvimento da cultura), disponibilidade de água no solo e variedades.

Estudando a deficiência hídrica para cana planta, ROSENFELD (1989) concluiu que o período mais sensível ao estresse hídrico é no início do estágio de desenvolvimento máximo da planta. Sendo assim, o período crítico para a cana plantada em fevereiro e junho é do 4º ao 8º mês de idade. Para a cana-de-açúcar plantada em outubro, o período mais crítico é do 8º ao 11º mês.

### 3.4. Resposta ao déficit hídrico

Sob condições de déficit hídrico, o fechamento dos estômatos é a primeira resposta de defesa da planta contra a dessecação, onde irá controlar a fixação do carbono e, conseqüentemente, irá reduzir a transpiração, de maneira a manter os reflexos diretos da fotossíntese (NOGUEIRA et al. 2005). Esse processo pode ocorrer mesmo antes de haver diminuição do conteúdo de água da folha (YORDANOV et al., 2000). Desta maneira, a planta sobrevive ao estresse, mas tem seu desenvolvimento reduzido (SILVA, 1998).

A expressão dos genes durante o estresse hídrico não garante que um produto gênico promova a habilidade da planta em sobreviver. Pois pode ocorrer a expressão gênica resultante de ferimento ou dano que tenha ocorrido durante o estresse, enquanto outros podem ser induzidos, mas não alteram a tolerância. Apesar disso, alguns genes são necessários para a tolerância ao estresse e o acúmulo dos produtos desses genes é uma resposta adaptativa (BRAY, 1993).

Essas respostas dependem dos mecanismos internos que integram as respostas celulares, sendo que tais respostas podem ocorrer em segundos, minutos ou horas após o estresse hídrico (BRAY, 1997), quando 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).

Em resposta a esses estresses, vários genes são super regulados, podendo minimizar o estresse e levar a adaptação do meio celular ou a tolerância da planta (MAHAJAN & TUTEJA, 2005). Deste modo, JUNIOR (2010) relata que as plantas quando expostas a períodos de estiagem, em determinadas regiões, ativam mecanismos fundamentais para sobrevivência, tais como, fechamento estomático, redução da área foliar e desprendimento das folhas.

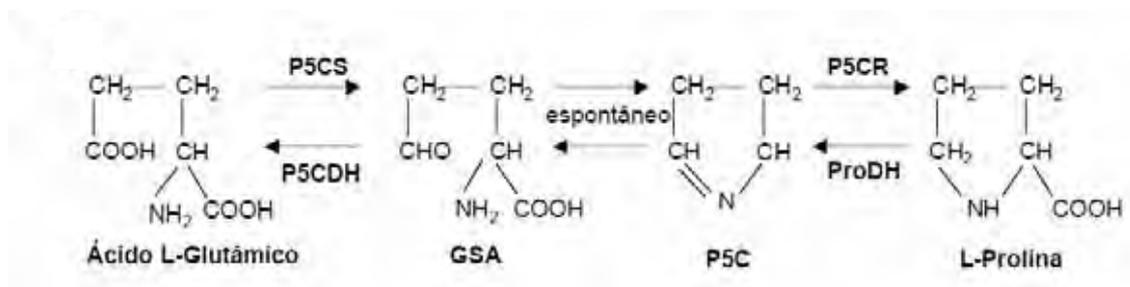
Em algumas cultivares ou espécies, o grau de tolerância pode ser determinado através da capacidade de acumular solutos compatíveis, os quais, além de atuarem no ajustamento osmótico, protegem as estruturas celulares contra os danos induzidos pela desidratação e oxidação (ANAMI et al., 2009). Como foi verificado anteriormente por

BRAY (1997), em resposta à deficiência hídrica, muitas plantas sintetizam e acumulam solutos orgânicos, tais como, proteínas, carboidratos, N--amino e prolina.

A prolina livre é classificada como um “ε – iminoácido”, devido à ligação do grupo amino a dois átomos de carbono, conferindo características de neutralidade à molécula (KAVI KISHOR et al., 2005). Aminoácidos são moléculas que contêm ambas porções amino (-NH<sub>2</sub>) e um grupo funcional carboxil (-COOH), no caso, a prolina contém uma porção imino (C=NH), um grupo funcional carboxil e um grupo imino secundário, tendo sido reportada como um importante osmoprotetor em muitas plantas (MOLINARI, 2006). Além disso, atua na integridade e proteção da membrana plasmática (MANSOUR et al., 1998).

De acordo com REDDY et al. (2004), por possuir um anel pirrolina, que confere uma baixa capacidade de ceder elétrons, a prolina forma um complexo de transferência de carga e sequestra O<sub>2</sub> livre. Assim, esse aminoácido pode reduzir o dano por fotoinibição nas membranas do tilacóide pelo seqüestro e redução da produção de íons superóxido.

O acúmulo deste aminoácido pode ocorrer por duas vias paralelas nas plantas, uma direta e outra via ornitina (KAVI KISHOR et al., 2005). Sob estresse hídrico, o acúmulo de prolina em células é ocasionado por duas vias, onde ocorre à ativação da sua biossíntese e a inativação da sua degradação (JINYUO et al., 2004). BARTELS & SUNKAR, 2005 verificaram que sob déficit hídrico, a prolina parece ser sintetizada principalmente pela via do glutamato, conforme ilustrado na Figura 1.



**Figura 1.** Via metabólica da biossíntese de prolina em plantas superiores, via glutamato. Ácido glutâmico g-semialdeído. GSA (P5C, D1-pirrolina-5-carboxilato), P5CS (P5C sintetase), P5CR (P5C redutase), ProDH (Prolina desidrogenase) e P5CDH (P5C desidrogenase) (MOLINARE, 2006).

Em plantas superiores, o aminoácido prolina é sintetizado a partir de glutamato via D1-pirrolina -5-carboxilato (P5C) por duas sucessivas reduções, as quais são catalisadas pelas enzimas P5C sintetase (*P5CS*) e P5C redutase (*P5CR*) (HARE et al., 1999), de modo que a expressão da P5CR é regulada por variações de potencial osmótico no citoplasma (WILLIAMSON & SLOCUM, 1992), e essa redução irá induzir a biossíntese da P5C, resultando na produção de prolina, por essa razão, o acúmulo da prolina está relacionado com mecanismo de ajustamento osmótico (DELAUNEY & VERMA, 1993).

Esse acúmulo pode ter funções no depósito de energia, na estruturação das estruturas sub-celulares, como componentes das cascatas de sinalização molecular do estresse e na constituição da parede celular das plantas, sendo esse, um dos seus principais constituintes (NEPOMUCENO et al., 2001). Além disso, esse acúmulo é encontrado em maior quantidade no citosol, contribuindo para o ajustamento osmótico deste e esse aumento pode estar relacionado com tolerância das plantas à desidratação (ASHRAF & FOOLAD, 2007).

Deste modo, BIDOIA et al. (2006), trabalhando com a cultivar de cana-de-açúcar SP79-1011, tolerante à deficiência hídrica, verificaram que conforme reduzia os níveis de água no solo, ocasionava o acúmulo de prolina livre.

### **3.5. Técnica de cDNA-AFLP**

Nos programas de melhoramento, o uso de diferentes técnicas para a seleção de materiais, como, por exemplo, os marcadores moleculares, tem gerado resultados positivos diminuindo o tempo entre a seleção e comercialização de novas cultivares (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Diversas são as técnicas empregadas para a identificação de genes, onde a expressão é diferencialmente regulada em resposta a vários tipos de estresse, sendo uma delas, a técnica de análise diferencial em reação de cadeia de polimerase (DDPCR – *differential display PCR*), construção de bibliotecas subtrativas por hibridização (SSH – *suppression subtractive hybridization*), análise serial da expressão gênica (SAGE), *chips* de DNA, microarranjos, AFLP (*amplified fragment length polymorphism*)

(RODRÍGUEZ; CANALES; BORRAS-HIDALGO, 2005) e uma técnica que combina cDNA com AFLP, desenvolvido por VOS et al. (1995), baseada na amplificação seletiva por PCR de fragmento de restrição a partir de cDNA ligados a adaptadores, desenvolvido por BACHEM et al. (1996) (LAMB, 2006).

Essa técnica é realizada em quatro passos, onde no primeiro ocorre a síntese de cDNA utilizando oligonucleotídeos poli-dT, seguido pela digestão dos cDNAs com duas enzimas de restrição e ligação dos adaptadores, no terceiro ocorre a pré-amplificação com oligonucleotídeos correspondentes nos adaptadores e o último passo consiste na amplificação seletiva dos fragmentos de restrição utilizando oligonucleotídeos com uma ou mais bases seletivas (BACHEM et al., 1998).

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

A técnica de cDNA-AFLP permite a comparação de qualquer quantidade de amostras (menos de 5 µg de RNA são necessários para até 240 reações) podendo detectar pequenas diferenças de expressão a partir de 10% (STEIN & LIANG, 2002), e comparado com outros métodos, essa técnica não requer a utilização de equipamentos especiais (YUXIN et al., 2007), além de apresentar baixo custo, em comparação com a técnica de *Differential Display* (DONSON et al., 2002). Esta técnica combina a característica de alto rendimento com uma alta sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção de genes raramente expressos e a distinção entre genes homólogos (REIJANS et al., 2003), sendo considerado também uma ferramenta flexível que pode ser usado mesmo quando a informação seqüência genômica ainda não está completa ou com todas as informações da seqüência disponíveis (KIVIOJA et al. 2005)

Neste contexto, a técnica de cDNA-AFLP pode auxiliar na identificação de genes envolvidos com o caráter de tolerância à seca em cana-de-açúcar, por meio da análise

comparativa de cultivares contrastantes para a tolerância, quando expostas às condições de seca (DEDEMO, 2011).

## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

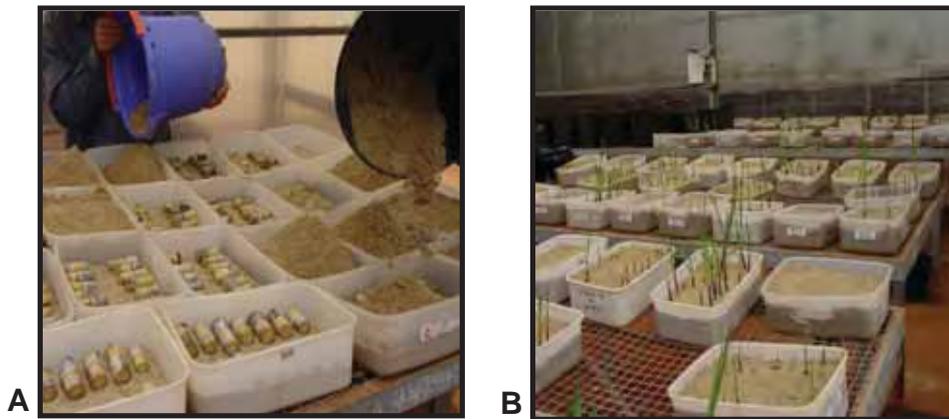
### **4.1. Local da Realização do Experimento.**

O trabalho de estresse hídrico em cana-de-açúcar, realizado durante os meses de setembro de 2008 a abril de 2009, foi instalado em casa de vegetação (Modelo “Poly Venlo” - Van der Hoeven) localizada no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal. A casa vegetação apresenta 3,50m de altura, com cortina de sombreamento (tela termo-refletora aluminizada malha 50% de sombra) fixa na lateral externa e dotada sombreamento móvel no teto, bem como de sistema de resfriamento e umidificação e ventiladores para eliminação do ar quente.

### **4.2. Material Vegetal**

Foram utilizados três cultivares de cana-de-açúcar classificados como tolerantes SP83-5073 e RB86-7515 (EMBRAPA, 2011) e a cultivar SP86-155, sensível ao estresse hídrico. A cultivar sensível foi avaliada através de experimentos em campo e classificada quanto à sua produtividade em períodos prolongados de seca (COPERSUCAR, 1999; CTC, 2007).

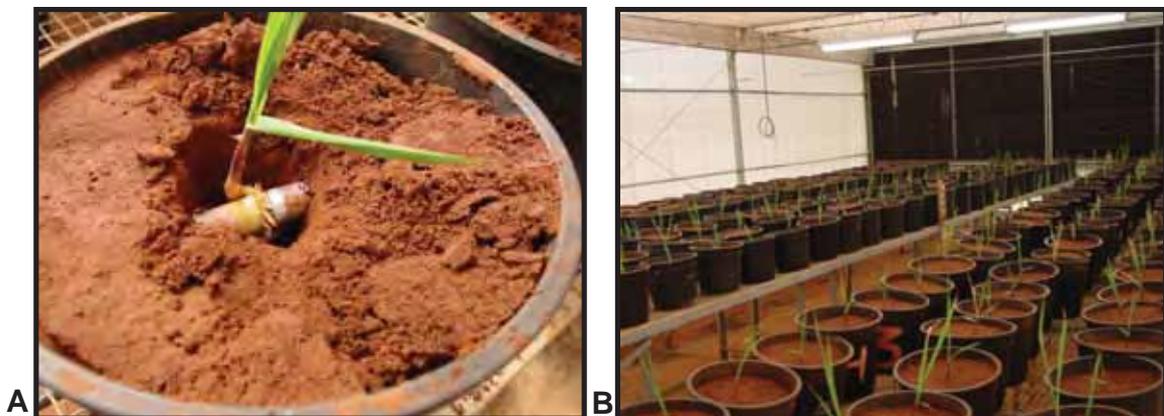
As plantas de cana-de-açúcar foram obtidas por meio de brotação de mini-toletes (6,5 e 7,5 cm de comprimento), contendo uma única gema, provenientes de soca de viveiro. Após o tratamento com fungicida sistêmico Piori Xtra® Syngenta (25 mL do fungicida para cada 10 L de água de torneira), de 14 a 16 mini-toletes foram distribuídos em bandeja plástica (30cm X 20cm x 10cm) coberta com areia peneirada e umedecida posteriormente (Figuras 2A e 2B).



**Figura 2.** Distribuição (A) e brotação dos mini-toletes em bandejas plásticas contendo entre 14 e 16 mini-toletes de cana-de-açúcar (B).

#### 4.3. Tratamentos e Delineamento Experimental.

Aos 35 dias após o plantio (DAP) para a cv SP83-5073, aos 36 DAP para a cv RB867515 e aos 24 DAP para a cv SP86-155, foram selecionadas as plântulas com base no desenvolvimento da parte aérea e das raízes e então transplantadas para vasos plásticos de 14,5L (uma plântula por vaso) (Figuras 3A e 3B) contendo solo Vermelho-Amarelo. O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados (DBC) e esquema fatorial de  $3 \times 2 \times 4$ , ou seja, três genótipos de cana-de-açúcar (SP83-5073, RB86-7515 e SP86-155), duas condições experimentais (tratamento e controle), quatro épocas de coleta (após 1, 3, 5 e 10 dias de suspensão de rega), com quatro replicatas biológicas, perfazendo um total de 96 unidades experimentais.



**Figura 3.** Transplante das plântulas nos vasos de 14,5 L (A). Distribuição na casa de vegetação (B).

O solo Vermelho-Amarelo, utilizado nesse trabalho, foi coletado no município de Catanduva, atual região de expansão da cultura da cana-de-açúcar. Após a coleta, foi realizada a calagem e correção dos nutrientes (macronutrientes: N, P e K e micronutrientes: cobre, zinco, ferro e boro) (Tabela 1). Para a realização desse processo, acrescentou-se a cada 500L de solo seco e peneirado, 0,5g de sulfato de cobre; 1,25g de sulfato de zinco; 2,50g de sulfato de ferro; 1,50g de Bórax (borato de sódio) misturados com 50g de cal. Foi adicionado ao solo 200g da fórmula 04:30:20 (NPK) Com aproximadamente cinco meses, as plantas receberam adubação de cobertura, aplicando-se via solução aquosa o equivalente a 2g de uréia para cada 50mL de água.

**Tabela 1.** Análises Físico-Química de amostras de solo Vermelho-Amarelo (PVA) realizadas pelo Laboratório de Análise de Solo e Planta (Departamento de Solos e Adubos/UNESP - Jaboticabal).

<b>Análise Química do Solo</b>									
pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V
	em	(resina)							
CaCl <sub>2</sub>	g.dm <sup>-3</sup>	mg.dm <sup>-3</sup>	-----mmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> -----						%
5,7	12	68	10	24	15	15	49	64	77
<b>Análise Química do Solo – Micronutrientes, S-SO<sub>4</sub> e Al</b>									
B	Cu	Fe	Mn	Zn	S-SO <sub>4</sub>	Al			
-----mg.dm <sup>-3</sup> -----					mmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>				
0,40	0,6	8,0	14	0,9	0,0				
<b>Caracterização Física</b>									
<b>Análise Granulométrica de Solo - Simples</b>									
Argila	Limo	Areia		Classe Textural					
		Fina	Grossa						
-----g.Kg <sup>-1</sup> -----									
169	35	622	174	Média					

#### 4.4. Cálculo para a Determinação da Umidade do Solo.

Após o transplante das plântulas para os vasos, as plantas foram monitoradas diariamente a fim de verificar e proporcionar bom desenvolvimento a todas as plantas. Para manter a umidade do solo na faixa de 65-75% da capacidade de campo (CC) foram utilizadas duas metodologias: o atmômetro de *Livingston* e a pesagem ao acaso dos vasos. O atmômetro de *Livingston* permite estimar a evapotranspiração (ET) por meio da variação do volume de água ( $\Delta Va$ ) em milímetros (mm) no reservatório (PORTO et al., 2000; BRONER & LAW, 1991). A reposição da quantidade de água perdida (ET) pelo sistema solo/planta foi realizada utilizando a fórmula:

$$ET = \Delta Va \text{ (mm)} \times 23,76 \text{ mL}$$

Onde:

23,76 mL: resultado de cálculo:

$\varnothing_{sup.}$  = Diâmetro superior do vaso;

$K_c$  = Coeficiente cultural de 40%.

A pesagem ao acaso de alguns vasos, utilizada para verificar se estava dentro da faixa de peso, calculada para o solo com umidade entre 65-75% da CC foi realizada concomitantemente com o atmômetro de *Livingston*. Ao pesarmos os vasos, a massa do conjunto vaso + solo + planta + água deveria estar entre 18,49 Kg (65 % CC) e 18,95 Kg (75 % CC), considerando a densidade da água como sendo igual a 1 ( $d_a = 1\text{g/cm}^3$ ). Sendo assim, esta faixa de valores de massa do conjunto (Kg) inclui a massa do vaso vazio e do solo seco, do valor médio da massa fresca da planta (parte aérea + raízes) e a massa correspondente ao volume de água para 65 ou 75% da CC.

Aos 186 DAP da cv SP83-5073 e aos 175 DAP da cv RB867515 e da cv SP86-155, iniciaram-se os tratamentos de supressão da rega por 1, 3, 5 e 10 dias. As plantas controle foram irrigadas diariamente de modo a manter a umidade do solo na faixa de 65-75 % da capacidade de campo.

#### 4.5. Condições Ambientais no Interior da Casa de Vegetação

As condições ambientais no interior da casa de vegetação, representados pela temperatura média e umidade relativa do ar foram medidos diariamente durante todo o período experimental.

#### 4.6. Coleta dos Palmitos de Cana-de-Açúcar.

Foram coletadas, em cada época de coleta (EC), ou seja, no 1º, 3º, 5º e 10º dias de déficit hídrico, os palmitos de cana-de-açúcar das plantas-controle e das plantas submetidas ao déficit hídrico. Os palmitos foram cortados em pequenos pedaços com o uso de estilete devidamente esterilizado e, posteriormente, estocado em tubos de polipropileno de 15 mL identificados e esterilizados (Figura 4) e imediatamente transferidos para o N<sub>2</sub> líquido e, posteriormente, armazenados no freezer a -80°C até o momento da sua utilização para a realização do experimento de cDNA-AFLP.



**Figura 4.** Coletas dos palmitos de cana-de-açúcar.

#### 4.7. Avaliações Biométricas em Casa de Vegetação

Foram realizadas, no dia anterior a cada época de coleta, avaliações biométricas no conjunto de plantas selecionadas (plantas-controle e submetidas à supressão da rega) das três cultivares de cana-de-açúcar. As análises biométricas analisadas foram:

altura inicial e final das plantas, diâmetro do colmo, número de folhas, matéria fresca de folhas bainhas e colmos, e matéria seca de folhas bainhas e colmos.

#### **4.7.1. Altura Inicial e Final das Plantas**

Para obter os valores da altura inicial das plantas, foi realizada a medição das plantas (controle e sob supressão da rega) cinco dias antes do início do experimento de supressão da rega. Para a altura final das plantas, a medição foi realizada um dia antes de cada coleta e ambas as medições foram feitas com o auxílio de uma trena, medindo-se desde sua base rente ao solo até a inserção da folha + 1 com bainha.

#### **4.7.2. Número de Folhas**

O número de folhas de cada planta foi obtido contando-se todas as folhas completamente desenvolvidas a partir da folha +1.

#### **4.7.3. Diâmetro do Colmo**

Para determinar o diâmetro do colmo, foi realizada a medida do ápice da planta para baixo, com o auxílio de paquímetro, na altura mediana do colmo (entre o 1° e 2° terços do colmo).

#### **4.7.4. Matéria Fresca de Folhas, Bainhas e Colmos.**

Concomitante à coleta das amostras dos palmitos para a extração de RNA total foram também coletadas todas as folhas e bainhas das plantas controle e sob estresse hídrico. O material coletado foi colocado em sacos de papel, identificados e pesados em balança eletrônica de precisão de 0,01 g para determinação da quantidade de matéria fresca.

#### 4.7.5. Matéria Seca de Folhas, Bainhas e Colmos.

Após a obtenção da matéria fresca, essas amostras passaram pelo processo de secagem, no qual foram colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar, previamente regulada a 65 °C, onde permaneceram por 72 horas, até que o material apresentasse massa constante. A completa remoção da água é um procedimento comum quando desejamos medir a quantidade de matéria que foi efetivamente incorporada.

#### 4.8. Determinação do Teor de Prolina Livre

Para determinação dos teores de prolina livre, foi utilizado o método ácido sulfossalicílico descrito por BATES et al. (1973). Com auxílio de uma balança analítica, pesou-se 0,5 mg de cada repetição, totalizando 2,0 mg de massa de matéria fresca de palmito de cana-de-açúcar, armazenado em ultrafreezer a -80°C. O material vegetal foi macerado em almofariz com 10 mL de ácido sulfossalicílico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>). Nessa fase, a solução homogeneizada foi submetida a duas filtrações para a eliminação parcial dos interferentes. Para a reação, foram usados tubos de ensaio, nos quais foram adicionados 2 mL do filtrado, que reagiram com 2 mL de ácido ninhidrina e 2 mL de ácido acético glacial, deixando-se a mistura em banho-maria a 100 °C por uma hora. Logo em seguida, os tubos de ensaio foram colocados em banho de gelo por 10 minutos para cessar a reação. Foram então, adicionados 4 mL de tolueno à mistura, seguida de agitação branda por 20 segundos. Logo após, formou-se uma mistura bifásica, e com o uso de uma pipeta Pasteur, foi retirado o sobrenadante e realizada a análise do equilíbrio da reação, ou seja, quantificação dos níveis de prolina livre. Foi utilizado o tolueno como branco e as leituras foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Ultrospect III, com comprimento de ondas de 520 nm, onde a intensidade da cor do cromógeno foi proporcional à concentração de prolina presente na solução em análise. Os teores de prolina livre nos palmitos foram calculados com base na massa fresca, segundo a fórmula:  $[(\mu\text{g prolina/mL} \times \text{mL tolueno})/115,5 \mu\text{g}/\mu\text{mol}] / [(\text{g}$

amostra)/5] =  $\mu\text{mol}$  de prolina/g massa fresca de palmito. Cada repetição (amostra) foi representada por um extrato simples dosado em duplicata.

#### **4.9. Análise Estatística**

A análise estatística dos dados provenientes das avaliações biométricas foi realizada utilizando o programa estatístico SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A análise de variância foi realizada pelo teste de  $F$  utilizando-se do teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para a comparação das médias.

#### **4.10. Extração de RNA Total**

Antes de iniciar a extração do RNA total, os utensílios de vidro e cerâmica utilizados foram previamente mantidos a 180°C por duas horas, de forma a impedir a ação de RNAses. O RNA total foi extraído a partir de 40 mg de amostra de palmito ("pool" das quatro repetições de cada condição experimental) utilizando o Kit "Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit" (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi eluído em 100  $\mu\text{l}$  de água livre de RNase e colocado imediatamente no gelo para prevenir a degradação e, posteriormente, foi estocado em ultrafreezer -80°C até a sua utilização.

##### **4.10.1 Quantificação do RNA Total.**

A determinação da concentração e pureza do RNA foi realizada através da leitura da absorbância no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm. Para verificar concentração do RNA extraído, é utilizado o valor de absorbância a 260 nm. A razão  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  determina a pureza do RNA extraído, e valores entre 1,8 e 2,0 indicam uma amostra de boa qualidade, livre de proteína. A razão  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  é utilizada como uma medida secundária de pureza do ácido nucleico e para amostras de boa qualidade de ácidos nucleicos deve apresentar valores acima de 2,0.

#### 4.10.2. Análise da Integridade do RNA Total em Gel de Agarose Desnaturante.

Foi verificada a integridade das amostras de RNA total utilizando 1,0 µg de RNA total ressuspensionado em 18 µL de uma mistura composta por Tampão de Amostra (750 µL formamida; 150 µL de tampão de corrida 10 x; 90 µL formaldeído; pitada azul de bromofenol em q.s.p. 1.125 µL com água-DEPC), Brometo de Etídeo (10 mg/mL) e água-DEPC. Essa mistura foi aquecida em banho-maria a 65°C por 7 minutos antes de sua aplicação em gel de agarose desnaturante a 1,5% (p/v) contendo 6,7 % de formaldeído (v/v). O gel foi submetido à eletroforese a 60V/cm constante por cerca de 50 minutos e, em seguida, exposto à luz ultravioleta (UV) em transiluminador, para a visualização das bandas de RNA ribossomal 28S 1x maior que a 18S (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A imagem do gel foi captada por uma câmara CCD (EASTMAN KODAK COMPANY; Rochester, New York).

#### 4.11. Síntese da 1ª Fita do cDNA.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada com 1,0 µg de RNA total utilizando-se o Kit *Revertaid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas) com os seguintes volumes:

Reagentes	Concentrações	Quantidades
Oligo(dT) <sub>18</sub>	100 µM	1 µL
Reaction buffer 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT	5X	4 µL
RiboLock™ RNase Inhibitor	20 U	1 µL
dNTP Mix	10 mM	2 µL
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase	200 U	1 µL
<b>Volume Final</b>	-	20 µL

A reação foi mantida no termociclador a 42 °C por 60 minutos e posterior inativação da enzima a 70 °C por 5 min.

#### 4.11.1. Procedimento para a Síntese da 2ª Fita do cDNA

Foi adicionado aos 20  $\mu\text{L}$  da mistura da reação de síntese da primeira fita do cDNA:

Reagentes	Concentrações	Quantidades
Reação de síntese da primeira fita do cDNA	-	20 $\mu\text{L}$
Reaction buffer da DNA Polimerase I	10 X	8 $\mu\text{L}$
RNase H	1,0 U	1 $\mu\text{L}$
DNA Polimerase I, E. coli	30,0 U	3 $\mu\text{L}$
Água ultrapura esterilizada	-	68 $\mu\text{L}$
<b>Volume Final</b>	-	100 $\mu\text{L}$

Logo após, os tubos de microcentrífuga foram incubados a 15 °C por 2 horas e, posteriormente, foi adicionado 12,5 U da enzima T4 DNA Polimerase (Fermentas) e novamente incubados a 15°C por 5 minutos. A reação foi interrompida por meio da adição de 5,0  $\mu\text{L}$  de 0,5 M de EDTA, pH 8,0.

#### 4.11.2. Purificação do cDNA por meio da Extração com Fenol/Clorofórmio

Foi adicionado ao produto da síntese do cDNA dupla-fita, quantidade de água ultra-pura esterilizada suficiente para 500  $\mu\text{L}$ . Logo após, acrescentou-se 500,0  $\mu\text{L}$  da mistura de fenol pH 8,0, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, respectivamente. A amostra foi homogeneizada rapidamente por inversão e, posteriormente, centrifugada a 12.000 X g a 4°C por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e então foi acrescentado 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio seguindo-se a centrifugação a 12.000 X g a 4°C por 5 minutos e o sobrenadante recuperado. Os dois últimos passos foram repetidos novamente.

- Precipitação do cDNA:

Foi transferida a fase aquosa (500  $\mu\text{l}$ ) para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e adicionado ao tubo, 50  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio (3M, pH 5,2) e 500  $\mu\text{L}$  de

isopropanol gelado. Centrifugou-se na velocidade máxima a 4°C por 30 minutos e o material foi mantido durante a noite em freezer -20°C.

- Lavagem do cDNA:

Centrifugou-se novamente a 12.000 X g por 10 minutos e, em seguida, descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 500 µL de etanol 70% gelado para remoção de sais residuais. Repetiram-se, novamente, os dois passos acima.

O precipitado passou por secagem à temperatura ambiente por 1 hora e foi dissolvido em 15,5 µL de água ultrapura esterilizada.

A leitura em espectrofotômetro NanoDrop foi realizada para a quantificação e a avaliação do grau de pureza do cDNA e logo após, foi armazenado em ultrafreezer -80°C até a sua utilização.

#### **4.12. Técnica de cDNA-AFLP**

Para a realização da técnica de cDNA-AFLP, utilizou-se o *AFLP® Plant Mapping kit (Regular Plant Genomes)* da PE-Applied Biosystems, Inc., CA, USA (1997), conforme recomendações do fabricante com algumas modificações.

##### **4.12.1. Reação de Restrição**

O primeiro passo dessa técnica é a digestão do cDNA por meio de duas enzimas de restrição: *EcoRI* de corte raro e *MseI* de corte frequente, que irão gerar fragmentos com extremidades compatíveis para a posterior ligação dos adaptadores *EcoRI* e *MseI*. Para cada amostra foi utilizado:

Reagentes	Concentrações	Quantidades
cDNA	300 ng	-
<i>EcoRI</i> (Fermentas, Lituânia)	10 U/ $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
<i>MseI</i> (Invitrogen Corp., CA, USA)	5 U/ $\mu$ L	0,1 $\mu$ L
Tampão React1 (Invitrogen Corp., CA, USA)	10x	1,25 $\mu$ L
Água ultrapura esterilizada	-	2,5 $\mu$ L
<b>Volume Final</b>	-	4,35 $\mu$ L

As amostras foram mantidas em termociclador a 37°C por 2 horas, seguidas de 15 minutos a 70°C para a inativação das enzimas.

#### 4.12.2. Reação de Ligação dos Pares de Adaptadores

Antes de iniciar a reação de ligação, coletou-se, em um novo tubo, para cada adaptador, uma alíquota de 0,33  $\mu$ L dos adaptadores das enzimas de restrição *EcoRI* e da *MseI* e foram aquecidos, separadamente, a 95°C por 5 minutos e então resfriados a temperatura ambiente por um período superior a 10 minutos. Em seguida, os dois adaptadores foram adicionados em um único tubo para posterior utilização. Para a reação de ligação, foi utilizado:

Reagentes	Quantidades
cDNA digerido	3,7 $\mu$ L
Tampão T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Inc)	0,5 $\mu$ L
T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Inc.)	0,2 $\mu$ L
adaptadores <i>EcoRI</i> e <i>MseI</i>	0,66 $\mu$ L
<b>Volume Final</b>	5,06 $\mu$ L

As reações de ligação foram mantidas a 20°C por 2 horas em termociclador e, após, foram diluídas 3X em TE (20 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA, pH 8,0).

#### 4.12.3. Reação de Amplificação Pré-Seletiva

Para realização da amplificação pré-seletiva foram utilizados 4,0 µL da reação de ligação, diluído 3X e foi adicionado ao tubo:

Reagentes	Concentrações	Quantidades
Reação de ligação	-	4,0 µL
Mix <i>primers</i> pré-seletivos ( <i>EcoRI</i> e <i>MseI</i> )	-	1,0 µL
<i>AFLP Amplification Core Mix</i> (tampão, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> e enzima DNA polimerase)	400U/µL	15,0 µL
Volume Final	-	20,0 µL

Nesta etapa, os fragmentos de cDNA com os adaptadores ligados nas duas extremidades amplificam exponencialmente, predominando assim, no produto final. As amostras foram amplificadas em termociclador de acordo com os parâmetros da Tabela 2 e diluídas 20x em TE<sub>0,1</sub> (20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0).

**Tabela 2.** Parâmetros utilizados na reação de amplificação Pré-Seletiva

Início	20 Ciclos			Término	
72°C	94°C	56°C	72°C	60°C	4°C
2 minutos	30 segundos	1 minuto	2 minutos	30 minutos	infinito

#### 4.12.4. Teste das Combinações de Iniciadores

O *AFLP® Plant Mapping kit (Regular Plant Genomes)* dá uma possibilidade de 64 combinações de iniciadores *EcoRI* e *MseI*. Apenas os iniciadores *EcoRI* são

marcados por fluorescência na extremidade 5' com uma das cores, amarela (NED), azul (FAM) ou verde (JOE), a depender do iniciador *EcoRI* usado para permitir a detecção dos fragmentos em seqüenciador automático de DNA.

Para testar a eficiência de polimorfismo das combinações de *primers*, foram testadas 24 combinações de iniciadores *EcoRI/MseI* (Tabela 3), onde foi utilizada amostra de cDNA das três cultivares de cana-de-açúcar, referente à terceira época de coleta, escolhida aleatoriamente.

**Tabela 3.** Combinações de pares de *primers* (*EcoRI-MseI*) para a técnica de cDNA-AFLP.

<i>Primer EcoRI*</i>	<i>Primer MseI*</i>
<b>AAG</b>	CAT
<b>AAG</b>	CAG
<b>AAG</b>	CTT
<b>AAG</b>	CTC
<b>AAC</b>	CTG
<b>ACA</b>	CAG
<b>ACA</b>	CTC
<b>ACA</b>	CTG
<b>ACC</b>	CTG
<b>ACC</b>	CAT
<b>ACC</b>	CAG
<b>ACC</b>	CAA
<b>ACC</b>	CTG
<b>ACC</b>	CTT
<b>ACG</b>	CAA
<b>ACG</b>	CAC
<b>ACG</b>	CTG
<b>ACT</b>	CTT
<b>ACT</b>	CAA
<b>ACT</b>	CTG
<b>ACT</b>	CAG
<b>AGC</b>	CTG
<b>AGG</b>	CAT
<b>AGC</b>	CAT
<b>AGC</b>	CTC

\* Em negrito os dois nucleotídeos adicionais dos *primers* seletivos. Os *primers* com inicial **ACA** e **ACT** são marcados com fluorófilo FAM (azul); os com inicial **AAG**, **ACG** e **AGG** são marcados com fluorófilo JOE (verde); e os com inicial **AAC**, **ACC** e **AGC** são marcados com fluorófilo NED (amarela).

#### 4.12.5. Reação de Amplificação Seletiva

Ao analisar as combinações de *primers* mais polimórficas (dados não apresentados), ou seja, presença de bandas na amostra da cana-de-açúcar tolerante desde que ausente na amostra da cana sensível (análise qualitativa), foram utilizados, 12 combinações de *primers* *EcoRI* e *MseI* (Tabela 4), para a realização da reação de amplificação seletiva.

**Tabela 4.** 12 combinações de *primers* utilizados na técnica de cDNA-AFLP.

<i>Primer EcoRI*</i>	<i>Primer MseI*</i>
ACT	CTG
ACT	CTT
ACT	CAA
ACG	CTG
ACA	CAG
AAG	CAT
ACC	CTG
AGC	CTG
AAC	CTG
AGG	CAT
ACC	CAT
AAG	CTC

Para a amplificação seletiva, foram utilizadas amostras da reação de pré-amplificação das três cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico nas quatro épocas de coleta estudadas e suas respectivas plantas controle. Foram utilizados 2,0  $\mu$ L do produto da reação de amplificação pré-seletiva diluída em:

Reagentes	Concentrações	Quantidades
Reação da pré-seletiva	-	2,0 µL
Tampão Taq DNA Polimerase	10 X	1,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,2 µL
dNTPs	2,5 mM	1,5 µL
combinação de primers <i>EcoRI</i>	10 µM	2,0 µL
combinação de primers <i>MseI</i>	10 µM	2,0 µL
Taq DNA Polimerase caseira	-	1,5 µL
Água ultrapura esterilizada	-	3,3 µL
<b>Volume Final</b>	-	15,0 µL

A PCR seletiva consiste de 40 ciclos, incluindo 10 ciclos *touchdown* com uma redução gradual da temperatura de anelamento de 66°C para 56°C em 1°C por passo, mantendo a 56°C por 35 ciclos, conforme os parâmetros descritos abaixo:

Início/Término	Ciclo			Nº de Ciclos
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	
94°C 2 min.	94°C 20 seg.	66°C 30 seg.	72°C 2 min.	1
94°C 2 min.	94°C 20 seg.	65°C 30 seg.	72°C 2 min.	1
94°C 2 min.	94°C 20 seg.	64°C 30 seg.	72°C 2 min.	1
94°C 2 min.	94°C 20 seg.	63°C 30 seg.	72°C 2 min.	1
94°C 2 min.	94°C 20 seg.	62°C 30 seg.	72°C 2 min.	1
94°C 2 min.	94°C 20 seg.	61°C 30 seg.	72°C 2 min.	1
94°C 2 min.	94°C 20 seg.	60°C 30 seg.	72°C 2 min.	1
94°C 2 min.	94°C 20 seg.	59°C 30 seg.	72°C 2 min.	1
94°C 2 min.	94°C 20 seg.	58°C 30 seg.	72°C 2 min.	1
94°C 2 min.	94°C 20 seg.	57°C 30 seg.	72°C 2 min.	1
94°C 2 min.	94°C 20 seg.	56°C 30 seg.	72°C 2 min.	35
60°C 30 min.	-	-	-	1
4°C continuamente	-	-	-	1

#### 4.13. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 6% Corado com Nitrato de Prata.

As amostras da amplificação seletiva das 12 combinações foram aplicadas em seis géis de poliacrilamida 6% desnaturante contendo 7,0 M de uréia. Toda esta parte experimental foi realizada no Centro de Cana-de-açúcar IAC/APTA com o auxílio da Dra. Luciana Rossini Pinto e Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza, as quais possuem as cubas de eletroforese necessárias e uma equipe com experiência neste tipo de trabalho.

### **Montagem de Gel de Poliacrilamida 6%:**

Antes de iniciar a montagem do gel, foi realizado o primeiro tratamento das placas com as soluções Bind e Repel.

Tratamento das placas com Bind (33.3 x 41.9 cm): Foi aplicado álcool (92,8% - comercial) em todas as partes da placa. Logo em seguida, acetona na frente das placas para as desengorduar. Em um tubo de 15 mL foi adicionado 3 mL da solução (95 mL álcool etílico + 5 mL Ác. Acético) e, posteriormente adicionou, 7 µL de g-methacryloxypropyl- trimethoxysilane (PlusOne Bind Silane). A solução foi gentilmente espalhada na placa para a ligação covalente do gel.

Tratamento das placas com Repel (33.3 x 39.4 cm): foi realizada a limpeza com álcool comercial e acetona, e a aplicação de 3 mL da solução 2% de dimethyldichlorosilane in octamethyl cyclo-octasilane (PlusOne Repel-Silane ES) para assegurar a posterior liberação do gel. Aguardou-se 5 minutos para a secagem.

Para a montagem das placas, foi utilizado espaçador de 0,4 mm entre as partes tratadas das placas. Logo após, lacrou-se as placas para que não ocorresse vazamento do gel. Após lacrar completamente as placas, foi aplicada, com o auxílio de uma seringa de 60 mL, a solução do gel (70 mL da solução de poliacrilamida 6% contendo uréia 8M e adição de 750 µL de persulfato de amônio e 45 µL de TEMED) e, em seguida, colocou o pente para a posterior aplicação das amostras. Aguardou-se 1 hora para a polimerização do gel de poliacrilamida. Realizou-se a “pré-corrída” em tampão TBE 1X (89 mM de Tris-base; 89 mM de ácido bórico; 2 mM EDTA) a 90W para o aquecimento do gel a aproximadamente 60°C;

### **Preparo das Amostras**

As amostras foram preparadas por meio da adição de tampão de formamida (10 mM NaOH; 0.05 % de xileno cianol [p/v]; 0.05% de azul de bromofenol [p/v]; 20 mM EDTA em formamida) na razão de 1:0,5. As amostras foram desnaturadas, em termociclador, a 95°C por 5 minutos e imediatamente colocados no gelo até a aplicação no gel. Foi aplicada, no gel, uma alíquota de 3,7 µL destas amostras, juntamente com a

aplicação de alíquotas dos marcadores de peso molecular de 10, 20 e 50 pb (Fermentas), previamente desnaturados com tampão formamida. A eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6% (p/v) em condição desnaturante (uréia), em tampão TBE 1X se deu a 55 W a 50-55°C por aproximadamente 3h. A coloração das placas foi realizada de acordo com o protocolo descrito por CRESTE, TULMANN-NETO e FIGUEIRA (2001).

#### **4.14. Visualização, Recuperação e Reamplificação dos Fragmentos**

Foi realizada uma análise visual dos géis de poliacrilamida 6 % por meio de um transluminador de luz branca. Nessa análise foi verificada a contagem manual dos fragmentos, seleção e estimação de seus pesos moleculares por meio da comparação de sua migração com a dos fragmentos dos marcadores moleculares. A seleção dos fragmentos expressos (FEs) foi determinada pela ausência do fragmento na cultivar sensível ao estresse hídrico quando submetida à supressão da rega. Foram considerados fragmentos exclusivos (FE-Ts) os fragmentos expressos apenas nas cultivares tolerantes submetidos a supressão da rega e ausentes em suas planta-controle. O tamanho molecular dos fragmentos foi estimado de acordo o protocolo descrito por DEDEMO (2011).

Os fragmentos selecionados foram excisados do gel, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, e mantidas em TE (20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0), incubado durante a noite a 4°C e então a 60°C por 2 horas e, finalmente, realizando três ciclos de congelamento e descongelamento e centrifugação rápida do resto da poliacrilamida conforme descrito por PATHAN et al. (2007).

As reamplificações foram realizadas nas mesmas condições de reação utilizadas anteriormente na amplificação seletiva, nessa etapa, para um volume final de 50 µL, substituindo-se o cDNA pré-amplificado por 10 µL da eluição da banda excisada e 25 mM dNTPs. O programa para reamplificação em termociclador foi o mesmo utilizado para o preparo da amplificação seletiva (ver item 4.12.5).

Para confirmar se ocorreu reamplificação e se a mesma foi específica, alíquotas de 8 µL de cada reação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1 % com

brometo de etídeo e visualizadas sob luz UV utilizando-se como marcador de massa molecular *ladder* de 700 pb.

#### 4.15. Purificação dos produtos de PCR referentes aos FEs-T

Para as reamplificações positivas e específicas, o produto de PCR contendo os fragmentos reamplificados foi purificado com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean up system* (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Foi determinada, após a purificação, a concentração e pureza do produto amplificado através da leitura da absorbância no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm.

#### 4.16. Clonagem dos FEs-T

A clonagem foi realizada com o vetor pGEM®-T *Easy Vector System I* (Promega, Alemanha) na razão de 3:1 (inseto:vetor), de acordo com as recomendações do fabricante. Esse vetor é linearizado com uma única timina no terminal 3' de ambas as extremidades, por ser linear, previne a recircularização e refina a eficiência de ligação dos produtos de PCR, por possuir uma adenina adicional em sua extremidade, gerada por certas DNA polimerases termoestáveis. Foram utilizados para cada reação:

Reagentes	Concentrações	Quantidades
Produto de PCR purificado	75 ng	-
2X Tampão de ligação	2X	5 µL
Vetor pGEM-T Easy	25 ng	0,5 µL
T4 DNA Ligase	3,0 U	1 µL
Água ultrapura esterilizada	-	-
<b>Volume Final</b>	-	10 µL

Logo após, a reação foi mantida no termociclador a 4 °C por 16 horas.

#### 4.17. Transformação Química dos FEs-T

Foram utilizados 3  $\mu\text{L}$  da reação de ligação em 50  $\mu\text{L}$  de células de *E. coli* (cepa DH10B) quimicamente competentes. Antes de iniciar a transformação, as células quimicamente competentes (armazenada em freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) foram descongeladas rapidamente no gelo e em seguida adicionou à reação de ligação. A mistura ficou no gelo por 30 minutos e logo após provocou o choque térmico de 30 segundos no banho-maria a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após o choque térmico, a mistura foi colocada imediatamente no gelo até completo resfriamento do tubo. Em seguida, foi transferida para 1,0 mL de meio de cultura SOC (1000  $\mu\text{L}$  de SOB, 40  $\mu\text{L}$  de glicose 20 % e 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}$  1M) e incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 hora sob agitação de 220 rpm. Após a incubação, a solução foi espalhada em placas de petri contendo meio de cultura 2XTY sólido e o antibiótico ampicilina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), juntamente com 40  $\mu\text{L}$  de *X-gal* 2% e 25  $\mu\text{L}$  IPTG a 100 mM. As colônias contendo o vetor com o DNA clonado (coloração branca) foram selecionadas e transferidas com o auxílio de palitos de madeira autoclavados, para placas tipo ELISA de 96 poços, contendo em cada pocinho, 150  $\mu\text{L}$  de meio de cultura 2XTY líquido com 8% de glicerol e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do antibiótico ampicilina. Por fim, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 16 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  e após a realização do inóculo, foram estocadas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.18. Preparação do DNA Plasmidial

Para a obtenção do DNA plasmidial, foi utilizado o *NucleoSpin® Plasmid kit* (MACHEREY-NAGEL, Alemanha) que remove os contaminantes, tais como sais, metabólitos e componentes celulares macromoleculares solúveis e o DNA plasmidial se liga à coluna de sílica e é eluído sob condições de baixa força iônica com tampão levemente alcalino, de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.19. Sequenciamento dos FEs-T

Para verificar se não havia mais de um tipo de transcrito na banda excisada do gel de poliacrilamida, foi realizada o sequenciamento de 16 clones, onde foi utilizado o método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (PE-Applied Biosystems, Inc., CA, USA). A reação foi realizada em microplacas contendo 100 ng de DNA plasmidial com os seguintes reagentes:

Reagentes	Concentrações	Quantidades
DNA	100 ng	-
Tampão Save Money (5 mM MgCl <sub>2</sub> , 200 mM Tris-HCl pH 9,0)	-	3 µL
<i>Primer T7</i> 95'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' ou <i>Primer SP6</i> (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3')	10 pmoles/µL	1 µL
BigDye Terminator	-	1 µL
Água ultrapura esterilizada	-	-
<b>Volume Final</b>	-	10 µL

Logo após, as amostras foram colocadas em um termociclador e submetidas ao seguinte ciclo:

Início	39 Ciclos		
	Desnaturação	Anelamento	Extensão
96°C 1 minuto	96°C 15 segundos	T7 (R): 51°C e SP6 (F): 47°C 15 segundos	60°C 4 minutos

#### - Lavagem das Reações para o Sequenciamento

A lavagem do produto da reação de amplificação foi feita adicionando-se 80 µL de isopropanol 75% e mantendo as amostras no escuro a 20 °C por 15 minutos. Logo após, as amostras foram então centrifugadas a 3.040 x g, por 30 minutos, a 20 °C. O

sobrenadante foi descartado por meio da inversão da placa em papel absorvente e em seguida, adicionou ao precipitado 200  $\mu$ L de etanol 70% para remoção do sal residual. As amostras foram então centrifugadas a 3.040 x g por 10 minutos a 20 °C. Novamente, o sobrenadante foi descartado conforme etapa descrita acima e o passo da lavagem com 200  $\mu$ L de etanol 70% foi repetido. Para que o etanol residual fosse completamente eliminado, foi realizada a inversão da microplaca em papel absorvente e realizado um pulso de centrifugação de 20 segundos usando 1 como valor de aceleração/desaceleração da centrífuga. As amostras foram secas por 15 minutos em estufa bacteriológica a 37 °C.

#### **- Sequenciamento dos FEs-T**

Para a realização do sequenciamento dos FEs, foi utilizado seqüenciador automático de DNA *Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer* (PE-*Applied Biosystems, Inc.*, CA, USA). Em cada amostra foi adicionado 10  $\mu$ L de formamida seguida de desnaturação a 95 °C por 5 minutos e colocadas no gelo imediatamente para posterior aplicação no seqüenciador.

#### **4.20. Análise dos FEs-T**

As seqüências obtidas foram analisadas pelo programa *Phred* (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998), *Phrap* (GREEN, 1996) e *cross\_match* (EWING & GREEN, 1998) para verificar a qualidade das bases e remover as seqüências de nucleotídeos correspondentes ao vetor de clonagem. Posteriormente, foram submetidas a pesquisas no banco de dados utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al, 1990) contra o banco NR, para a identificação de similaridades com seqüências de proteínas já descritas na base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Escolha do material vegetal (palmito)

O palmito, região meristemática apical, representa a fonte pós-embriônica de todos os órgãos da parte aérea da planta e, provavelmente, é constituído de alguns recursos genéticos de proteção e adaptação das plantas para os fatores externos (JOVINO, 2007). Por ser uma região meristemática, funcionam como sensores e, em resposta ao estresse sofrido, iniciam vários processos, fazendo com que a planta se adapte as novas mudanças (FERRO, 2008). De acordo com INMAN\_BAMBER & SMIT (2005), sob estresse hídrico as folhas da cana-de-açúcar tendem a se acumular no cartucho, com a redução do estresse, esse acúmulo permite uma recuperação rápida de expansão da área foliar. Na Figura 5 podemos observar a localização do palmito coletado no experimento.

Por essa razão, foi realizado o estudo da expressão gênica sob estresse hídrico com o palmito de cana-de-açúcar, utilizando a técnica de cDNA-AFLP, a fim de obter novos resultados, tendo em vista a escassez de trabalhos descrito na literatura.



**Figura 5.** Esquema de uma plântula de cana-de-açúcar sinalizando o local da amostragem (A). Corte transversal evidenciando a região central do palmito (B) (Fonte: CLEMENTS, 1980).

## 5.2. Determinação da Umidade do Solo

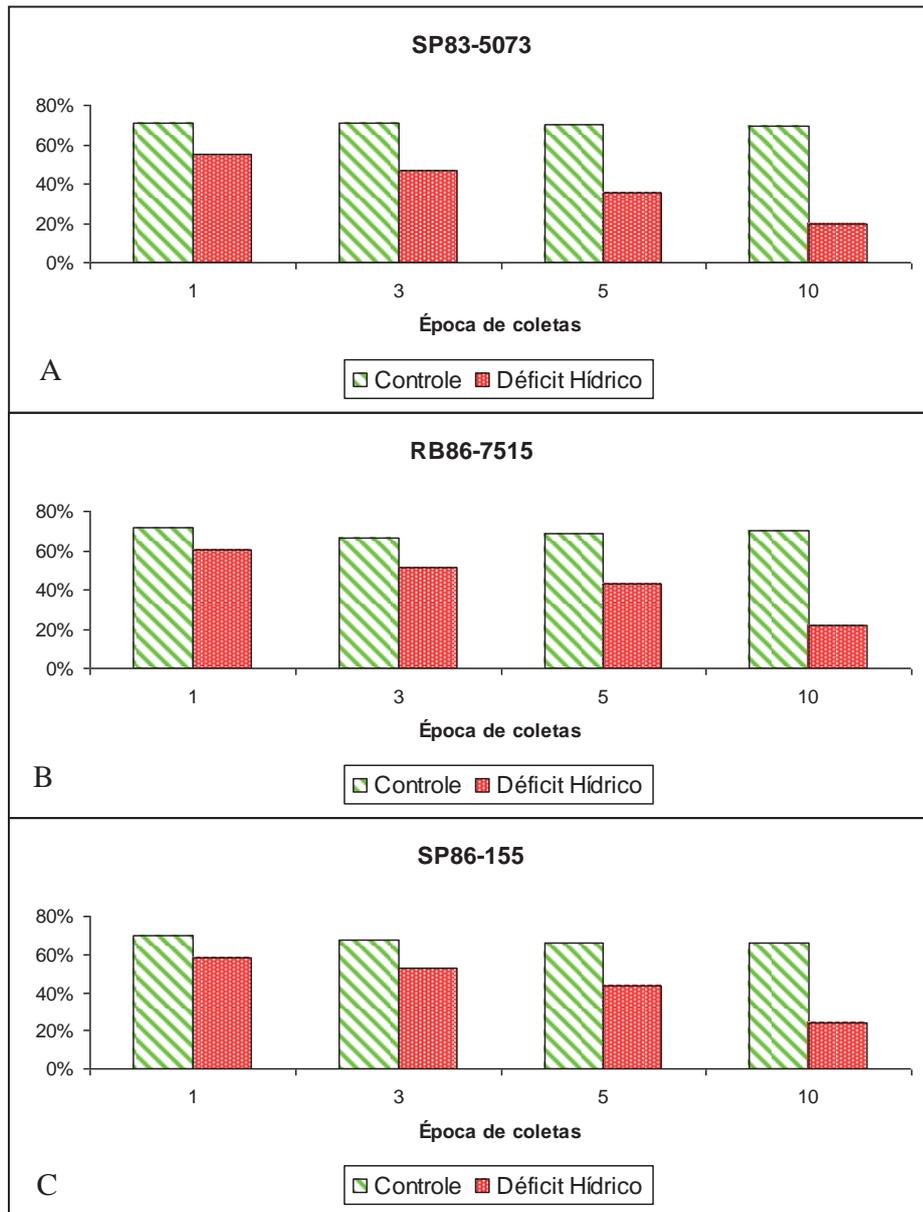
Para determinar a umidade do solo nos dois regimes hídricos (controle e sob estresse hídrico) foi realizado a média dos valores obtidos com a pesagem dos vasos após a remoção da parte aérea das plantas.

As condições experimentais utilizadas foram suficientes e adequadas para a indução do estresse hídrico, como pode ser verificado nas plantas controle (sem supressão da rega) das cultivares de cana-de-açúcar SP83-5073, RB86-7515 e SP86-155, conforme ilustrado na Figura 6A, 6B e 6C, respectivamente. Além disso, as plantas sob estresse hídrico, apresentaram uma redução da porcentagem de poros preenchidos com água ao longo das épocas de coleta.

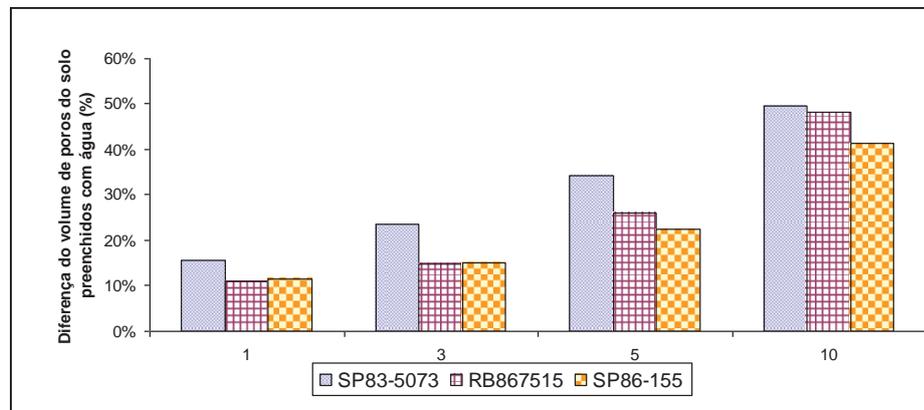
Na Figura 7, pode-se observar a diferença do volume de poros do solo preenchidos com água ( $DVP_a$ ) das plantas controle e sob estresse hídrico durante o período de supressão da rega nas três cultivares de cana-de-açúcar e destacar a SP83-5073 com um aumento na diferença do volume de poros do solo preenchidos com água com 1, 3 e 5 dias de supressão da rega. Esse resultado pode estar relacionado com a característica genotípica da cultivar por possuir uma maior capacidade de absorção de água, o que lhe confere maior tolerância ao estresse hídrico. Com 10 dias, as três cultivares mantiveram aproximadamente as mesmas diferenças de poros do solo preenchido com água.

## 5.3. Condições Ambientais no Interior da Casa de Vegetação

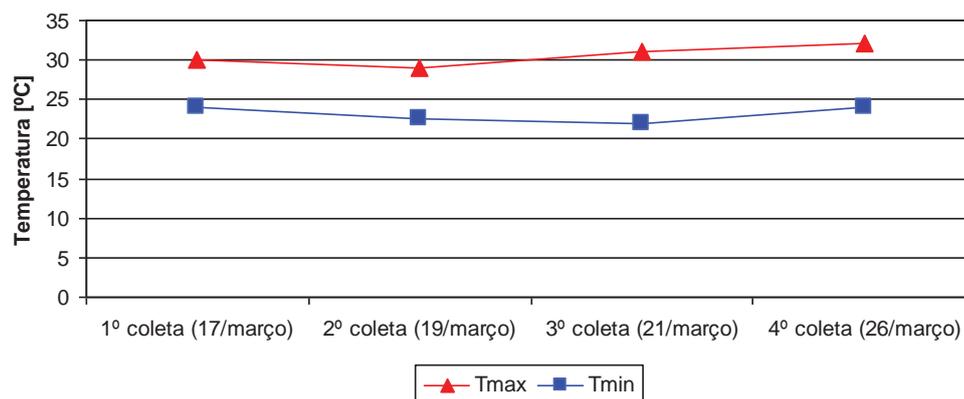
Durante todo o período experimental que ocorreu nos meses de setembro de 2008 a abril de 2009, realizou-se a medição da temperatura média no interior da casa de vegetação, que foi de  $27,39^{\circ}\text{C} \pm 2,31^{\circ}\text{C}$ , com máxima de  $31,00^{\circ}\text{C} \pm 2,38^{\circ}\text{C}$  e mínima de  $22,19^{\circ}\text{C} \pm 1,94^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa do ar com variação de  $60,44 \pm 17,44\%$ . De acordo com ALMEIDA et al. (2008), para a cana-de-açúcar, o intervalo entre  $25^{\circ}\text{C}$  e  $33^{\circ}\text{C}$  é muito importante para o desenvolvimento vegetativo da cultura. Na Figura 8 estão ilustradas as temperaturas máximas e mínimas durante as quatro épocas de coleta.



**Figura 6.** Porcentagem de poros do solo preenchidos com água nas três cultivares de cana-de-açúcar submetidas a 1, 3, 5 e 10 dias de supressão da rega. SP83-5073 - Tolerante (A), RB86-7515 - Tolerante (B) e SP86-155 - Sensível (C).



**Figura 7.** Diferença do volume de poros do solo preenchidos com água entre os dois regimes hídricos, ou seja,  $DVP_a = \text{solo}_{\text{controle}} - \text{solo}_{Dh}$ , nas três cultivares de cana-de-açúcar submetidas a 1, 3, 5 e 10 dias de supressão da rega.



**Figura 8.** Temperatura máxima e mínima no interior da casa de vegetação durante o período de déficit hídrico.

#### 5.4. Análise Estatística dos Parâmetros de Crescimento

Para facilitar a interpretação dos resultados obtidos por meio da análise estatística, à discussão encontra-se separada por parâmetros avaliados.

De maneira geral, o estresse hídrico sofrido pelas três cultivares de cana-de-açúcar SP83-5073, RB86-7515 e SP86-155 submetidas a 1, 3, 5 e 10 dias de supressão da rega provocou diferenças estatisticamente significativas em todos os parâmetros analisados nos fatores: estresse, cultivar, coleta e nas interações estresse x coleta. No entanto, para as interações estresse x cultivar, cultivar x coleta e estresse x

cultivar x coleta, não foi observada diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste  $F$  para nenhum parâmetro estudado, provavelmente devido ao curto tempo de supressão da rega sofrido pelas plantas (Tabela 5).

**Tabela 5** – Resumo da análise de variância para os parâmetros analisados das cultivares de cana-de-açúcar SP86-5073, RB86-7515 e SP83-155, cultivadas em casa vegetação e submetidas à 1, 3, 5 e 10 dias de supressão da rega. Jaboticabal, SP. 2008-2009.

Fatores	Valores de F									
	Altura inicial das plantas (cm) (AIP)	Altura final das plantas (cm) (AFP)	Diferença da AIP e AFP (D <sub>AIF</sub> )	Número de folhas de folhas (NF)	Diâmetro do colmo (mm) (DC)	Matéria fresca de folhas/bainha (MFFB)	Matéria fresca de colmos (MFC)	Matéria seca de folhas/bainha a (MSFB)	Matéria seca de colmos (MSC)	
Estresse	0,03 <sup>NS</sup>	2,86+	8,52*	6,27**	0,04 <sup>NS</sup>	33,91***	1,01 <sup>NS</sup>	1,94 <sup>NS</sup>	1,52 <sup>NS</sup>	
Cultivar	161,32***	130,04***	2,93+	66,18***	44,89***	32,36***	2,29+	26,57***	2,22 <sup>NS</sup>	
Coleta	2,78**	2,55 <sup>+</sup>	4,67*	0,55 <sup>NS</sup>	0,64 <sup>NS</sup>	16,43***	1,73 <sup>NS</sup>	1,71 <sup>NS</sup>	4,52**	
Interação										
Estresse X Cultivar	0,01 <sup>NS</sup>	0,75 <sup>NS</sup>	1,04 <sup>NS</sup>	1,12 <sup>NS</sup>	0,13 <sup>NS</sup>	0,85 <sup>NS</sup>	0,66 <sup>NS</sup>	0,36 <sup>NS</sup>	0,18 <sup>NS</sup>	
Interação										
Estresse X Coleta	0,01 <sup>NS</sup>	0,44 <sup>NS</sup>	1,05 <sup>NS</sup>	0,95 <sup>NS</sup>	0,77 <sup>NS</sup>	28,83***	0,89 <sup>NS</sup>	1,83 <sup>NS</sup>	0,64 <sup>NS</sup>	
Interação										
Cultivar X Coleta	1,65 <sup>NS</sup>	0,60 <sup>NS</sup>	1,07 <sup>NS</sup>	1,52 <sup>NS</sup>	0,64 <sup>NS</sup>	0,53 <sup>NS</sup>	0,46 <sup>NS</sup>	0,65 <sup>NS</sup>	0,62 <sup>NS</sup>	
Interação										
Estresse X Cultivar X Coleta	0,01 <sup>NS</sup>	0,30 <sup>NS</sup>	1,02 <sup>NS</sup>	0,33 <sup>NS</sup>	1,46 <sup>NS</sup>	1,27 <sup>NS</sup>	0,40 <sup>NS</sup>	0,67 <sup>NS</sup>	0,31 <sup>NS</sup>	
Coefficiente de Variação (%)	9,04	9,31	47,89	9,67	7,73	14,87	22,80	14,09	27,16	

<sup>NS</sup> Não significativo pelo teste F

\*\*\*significativo (P<0,001) pelo teste F

\*\*significativo (P<0,01) pelo teste F

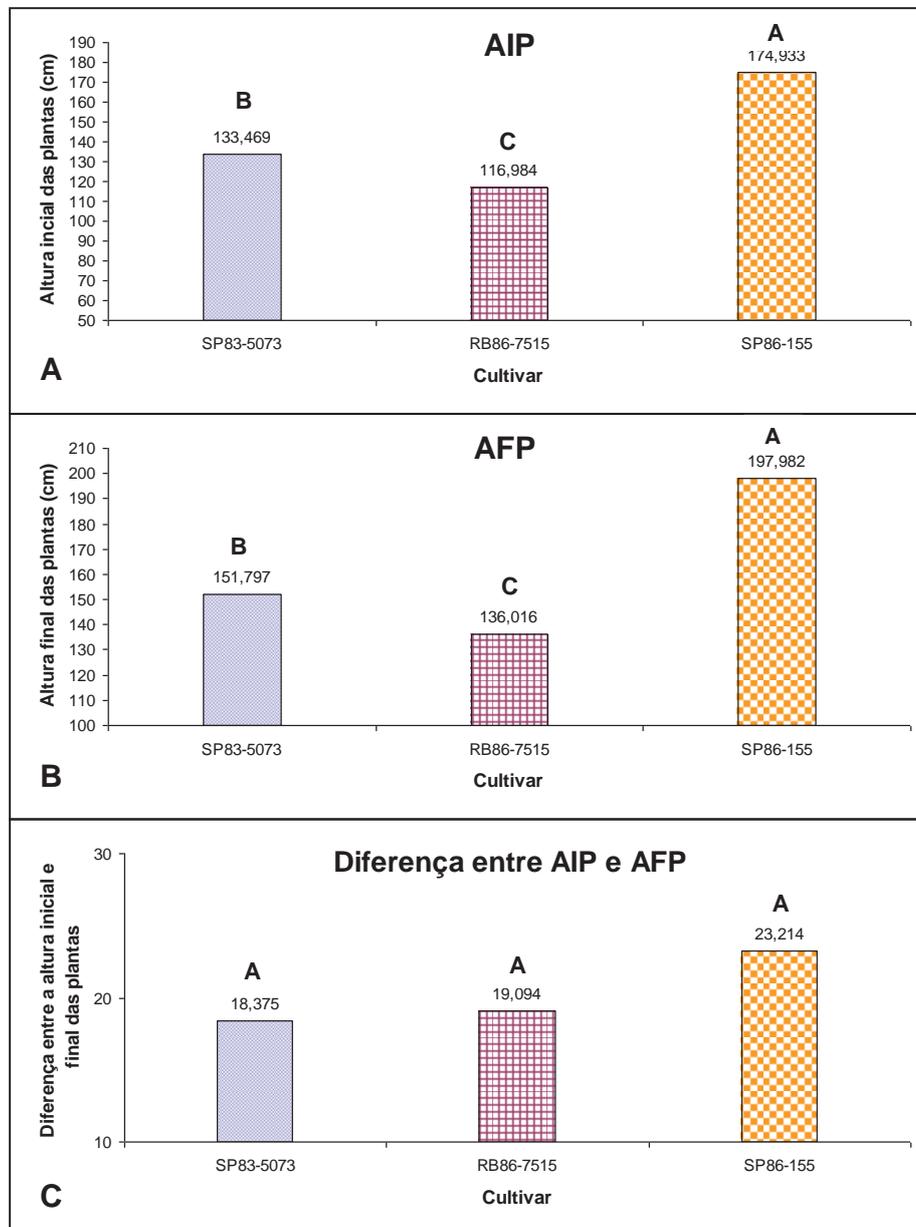
\*significativo (P<0,05) pelo teste F

+significativo (P<0,10) pelo teste F

#### 5.4.1 Altura inicial e final da planta (AIP e AFP)

De acordo com a Tabela 5, os resultados obtidos pela análise de variância tiveram efeito significativo no parâmetro altura inicial da planta promovido pelos fatores cultivar e coleta. No caso do parâmetro altura final da planta a diferença foi significativa para o fator cultivar.

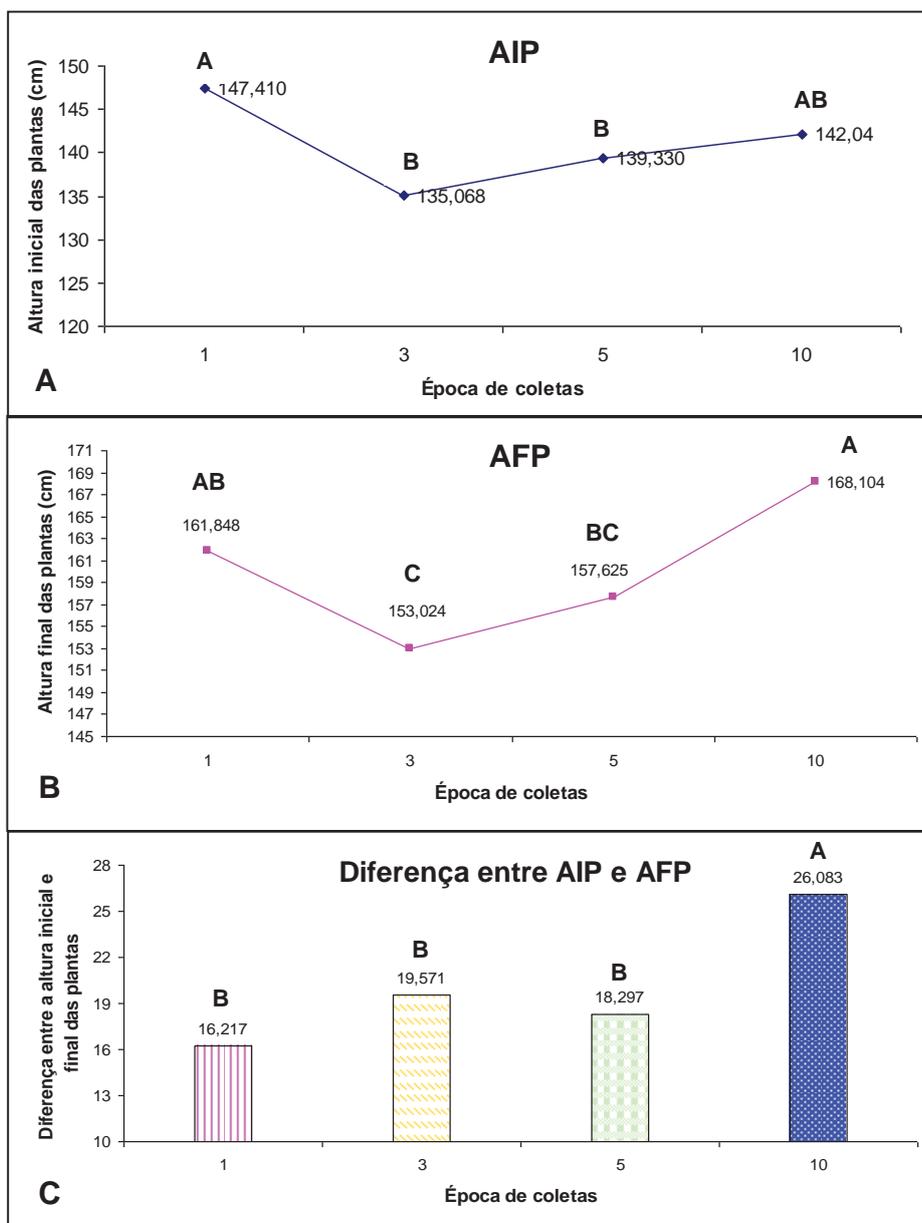
Ao analisar a Figura 9A, pode se observar que a maior média para a AIP foi encontrada na SP86-155 e a menor média na RB86-7515. Do mesmo modo, para a AFP, as duas cultivares, após 10 dias de supressão da rega, não reduziram seu crescimento, ou seja, continuaram crescendo e mantiveram a maior média e a menor média para a SP86-155 e RB86-7515, respectivamente (Figura 9B). Para verificar se as cultivares foram estatisticamente diferentes em relação à altura das plantas, foi realizada a diferença entre altura inicial e final das plantas, ou seja,  $D_{AIF.} = AFP - AIP$  (Figura 9C). Ao comparar essa diferença de altura entre as três cultivares de cana-de-açúcar, foi observado que não houve diferença significativa de altura entre as cultivares.



**Figura 9.** Efeito da variável Cultivar - Altura inicial das plantas (A) - Altura final das plantas (B) - Diferença entre a altura inicial e final das plantas (C). Médias seguida por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao longo do experimento de supressão da rega, houve diferenças significativas para a AIP e AFP promovido pela variável coleta, onde foi observado que para a AIP a maior média foi verificada na 1<sup>o</sup> coleta e as outras coletas não diferiram entre si, sendo que a quarta coleta não diferiu da primeira (Figura 10A). No caso da AFP, a 4<sup>o</sup> coleta se destaca com uma maior média, mas não diferindo da primeira coleta. Esta por sua vez, não diferiu da terceira coleta, que também não diferiu da segunda, sendo essa a época que apresentou a menor média (Figura 10B), ou seja, mesmo sob déficit hídrico, houve uma tendência de crescimento.

Para confirmar esses resultados, a Figura 10C mostra, por meio da diferença entre a altura inicial e final das plantas ( $\text{Diferença} = \text{AFP} - \text{AIP}$ ), que a 4<sup>o</sup> coleta se diferenciou estatisticamente das outras coletas e, com isso, pode-se afirmar que as plantas continuaram o seu crescimento mesmo estando submetidas a mais de 5 dias sob déficit hídrico.

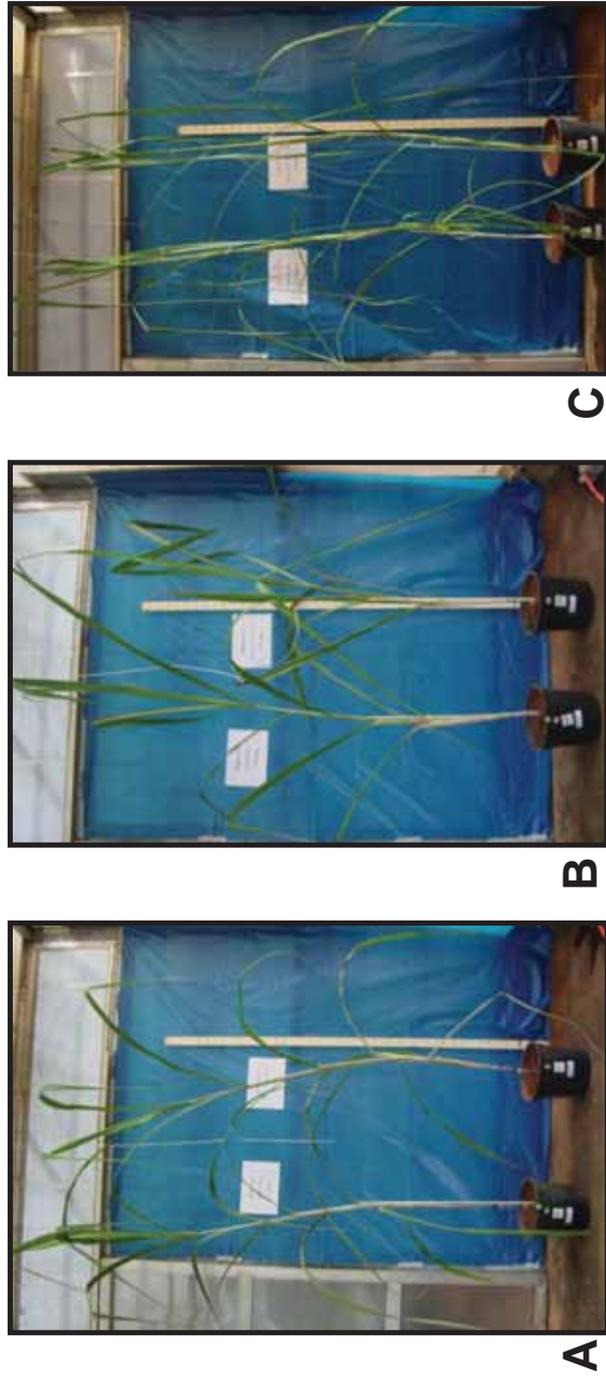
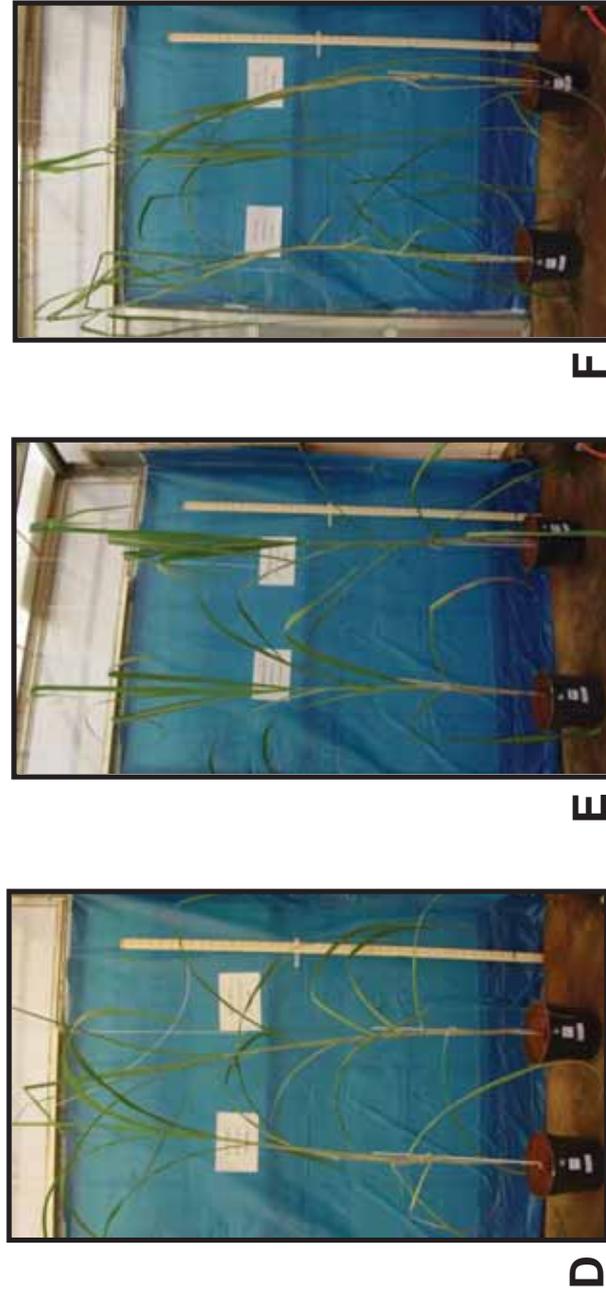


**Figura 10.** Efeito da variável Época de coleta –Altura inicial das plantas (A); Altura final das plantas (B) e Diferença entre a altura inicial e final das plantas (C). Médias seguida por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Esse aumento no crescimento das plantas está relacionado, diretamente, com o aumento na altura final das plantas, estando de acordo com os resultados obtidos por MACHADO et al. (2009) que, ao avaliarem as respostas de dois genótipos de cana-de-açúcar, em três fases distintas, verificaram que o genótipo

IACSP 94-2094 foi o menos afetado pela falta de água e manteve o crescimento, enquanto que o IACSP 96-2042 apresentou menor crescimento da planta e, ao comparar a altura dos dois genótipos, sugeriram que a IACSP 94-2094 possa ser tolerante e a IACSP 96-2042 sensível ao estresse hídrico. O mesmo foi observado por GUIMARÃES (2007), que verificou que houve uma tendência de diminuição do crescimento e diâmetro do colmo nas cultivares de cana-de-açúcar suscetíveis ao estresse biótico (*Mahanarva fimbriolata*) ao longo do tempo de infestação enquanto que para a cultivar tolerante foi verificado o oposto. Embora SILVA et al. (2008), trabalhando com quatro famílias de cana-de-açúcar sob condições de déficit hídrico, observaram que é possível considerar a variável altura da planta como um dos indicadores de tolerância ao estresse hídrico. Nesse trabalho, deve-se levar em consideração se as cultivares estudadas diferem em seu padrão de crescimento, antes de serem submetidas à supressão de rega, provavelmente devido às suas características genotípicas.

Após a análise dos gráficos podemos verificar, por meio das imagens ilustradas nas Figuras 11 e 12, as características genotípicas das três cultivares de cana-de-açúcar submetidas a 1, 3, 5 e 10 dias de supressão da rega, em comparação com suas plantas controle. A SP83-5073, por ter característica de desenvolvimento vigoroso e possuir colmos médios a longos, sendo considerada tolerante ao déficit hídrico, em todas as épocas de coletas, as plantas sob estresse hídrico, comparada com sua respectiva planta controle, visivelmente não sofreram com a falta d'água (Figura 11A, 11D, 12G e 12J). A RB86-7515, continuou com suas características de crescimento rápido e hábito de crescimento ereto, e após a supressão da rega, se diferenciou da sua planta controle apenas no 10º dia de déficit hídrico (Figura 11B, 11E, 12H e 12K). Já a SP86-155, considerada sensível ao estresse hídrico, se difere das outras cultivares por apresentar colmos finos e longos. Foi possível observar, no decorrer do experimento, que as plantas sob estresse hídrico sentiram muito a falta d'água, principalmente na última coleta devido ao aumento de folhas secas, quando comparada com sua planta controle (Figura 11C, 11F, 12I e 12L).

**A****B****C****D****E****F**

**Figura 11.** Aspecto fenotípico das três cultivares de cana-de-açúcar (SP83-5073, RB86-7515 e SP86-155, respectivamente) durante o 1º dia de coleta (**A, B e C**) e o 3º dia de coleta (**D, E e F**). Planta-controlê à esquerda e planta sob estresse hídrico à direita.



I



H



G



L



K



J

**Figura 12.** Aspecto fenotípico das três cultivares de cana-de-açúcar (SP83-5073, RB86-7515 e SP86-155, respectivamente) durante o 1º dia de coleta (G, H e I) e o 3º dia de coleta (J, K e L). Planta-controle à esquerda e planta sob estresse hídrico à direita.

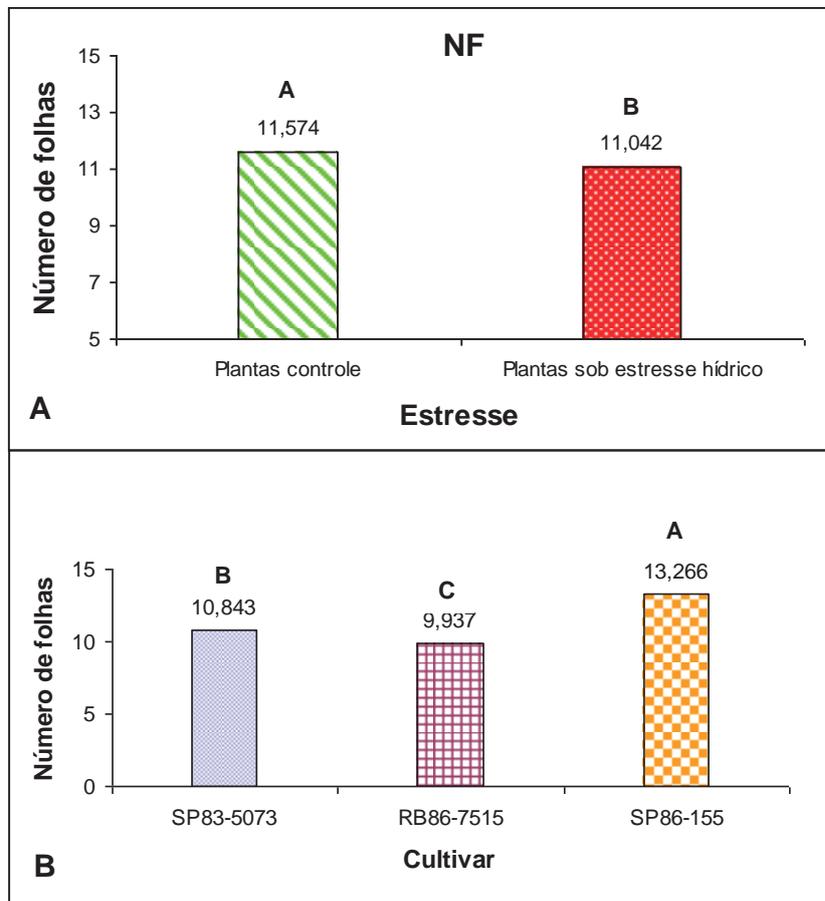
#### 5.4.2. Número de Folhas (NF)

De acordo com os resultados da análise de variância, houve efeito significativo do parâmetro número de folhas promovido pelos fatores estresse e cultivar (Tabela 5).

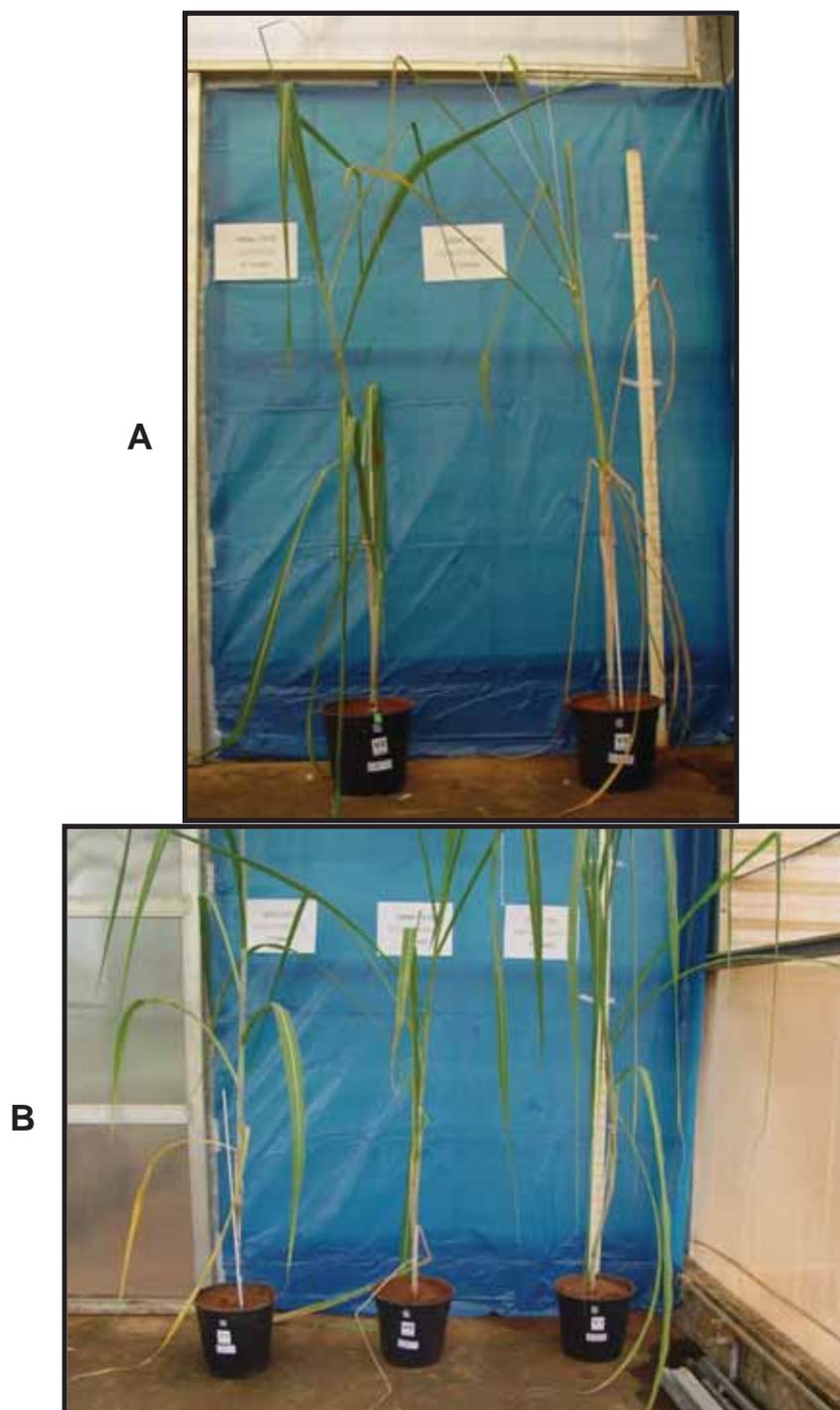
Ao comparar as médias do NF entre as plantas controle e submetidas ao estresse hídrico (Figura 13A e 14A), foi observada a menor média nas plantas sob estresse hídrico em relação às plantas controle (sem supressão da rega). O mesmo foi observado por SMIT & SINGELS (2006) que trabalhando com duas cultivares de cana-de-açúcar (NCo3676 e N22) submetidas à supressão da rega, verificaram que simultaneamente ocorreu uma redução do número de folhas verdes e um aumento da taxa de senescência foliar em ambas as cultivares, após 38 dias de seca. O mesmo foi observado nesse experimento com 10 dias de déficit hídrico. Em condições de deficiência hídrica, o estresse limita não apenas o tamanho, mas também o número de folhas (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Analisando o NF entre as cultivares, a menor média foi encontrada na cultivar tolerante, RB86-7515, contrastando com a cv SP86-155 sensível ao estresse hídrico (Figura 13B e 14B). Esse resultado corrobora com os resultados obtidos por CARLIN & SANTOS (2009), ao constatarem que a deficiência hídrica reduziu o número de folhas em 34,2% nos três tratamentos de disponibilidade hídrica em plantas jovens de cana-de-açúcar resistentes à seca.

Desta maneira, foi verificado que a média do NF foi maior na cultivar sensível ao déficit hídrico durante toda a época de coleta. Sendo assim, acredita-se que esses resultados estejam relacionados com as características genóticas da SP86-155.



**Figura 13.** Número de folhas. Efeito da variável Estresse (A); Efeito da variável Cultivar (B); Interação cultivar e coleta (C). Médias seguida por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 14.** Número de folhas. Cv RB86-7515, respectivamente, planta controle e planta sob estresse hídrico na 4<sup>o</sup> coleta (10 dias de supressão da rega) (A); Cv SP83-5073, Cv RB86-7515 e Cv SP86-155, respectivamente, plantas sob estresse hídrico na 3<sup>o</sup> coleta (5 dias de supressão da rega) (B).

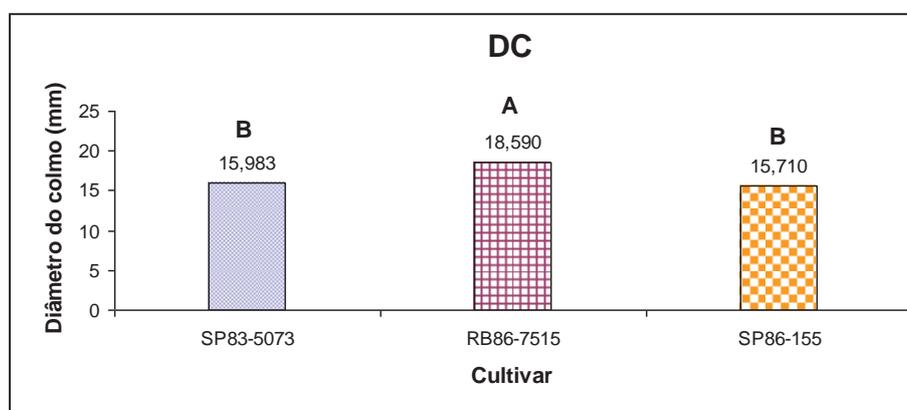
### 5.4.3. Diâmetro do Colmo (DC)

Pela análise de variância, foi observada uma diferença significativa para o parâmetro diâmetro do colmo promovido pelo fator cultivar (Tabela 5).

Entre as três cultivares de cana-de-açúcar submetidas a quatro épocas de coleta, a RB86-7515 se destaca das outras cultivares com a maior média e as outras cultivares não diferiram entre si (Figura 15). SILVA et al. (2008), concluíram que além da variável altura da planta, o diâmetro do colmo seria um outro indicador de tolerância à seca em cultivares de cana-de-açúcar.

Não foi estatisticamente significativo o parâmetro diâmetro do colmo promovido pelo fator estresse, provavelmente o curto período de déficit hídrico (10 dias) imposto nesse trabalho não foi suficiente para reduzir o diâmetro do colmo nas plantas de cana-de-açúcar sob estresse hídrico. Do mesmo modo, SILVA (2010) verificou que três genótipos de cana-de-açúcar submetidos a níveis severos de deficiência hídrica em casa de vegetação não apresentaram redução significativa para o diâmetro do colmo.

Assim, pode-se concluir, que a diferença entre as cultivares em relação ao diâmetro de colmo não foi afetada pelo déficit hídrico, constituindo-se de um comportamento genético de cada cultivar, onde a RB86-7515 melhor se desenvolveu, obtendo maiores médias nesta característica de acordo as condições de pesquisa deste trabalho.



**Figura 15.** Efeito do fator Cultivar para o parâmetro diâmetro do colmo . Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 5.4.4. Matéria fresca de folhas, bainhas e colmos (MFFB – MFC)

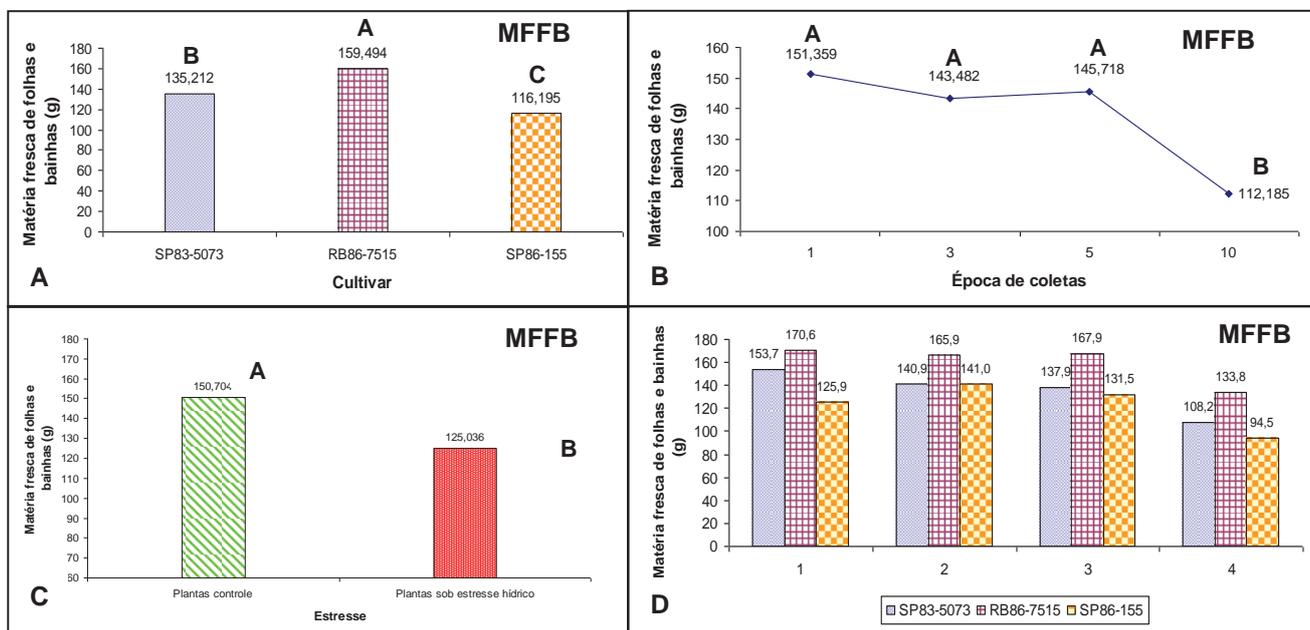
De acordo com a Tabela 5, pela análise de variância, foi observado efeito significativo no parâmetro massa fresca de folhas e bainhas (MFFB) ocasionado pelos fatores estresse, cultivar, coleta e pela interação cultivar x coleta. Para o parâmetro matéria fresca de colmos (MFC) houve efeito significativo promovido pelo fator cultivar.

Analisando o fator cultivar para o parâmetro MFFB, a RB86-7515 obteve a maior média entre as cultivares e a menor média foi encontrada na cv SP83-155 (Figura 16A). GUIMARÃES (2007), estudando a resistência varietal da cana-de-açúcar a *M. fimbriolata* em três genótipos verificou que a massa fresca foi superior na cv tolerante ao estresse biótico.

Para o fator coleta, houve uma redução significativa na média de MFFB a partir da 3<sup>o</sup> coleta (Figura 16B). Esse resultado é esperado em experimento de supressão da rega, sugerindo que as plantas durante o período de déficit hídrico, podem ser afetada negativamente em vários processos fisiológicos, sobretudo levar a uma redução na eficiência do uso da água na fotossíntese (INMAN-BAMBER, 2004).

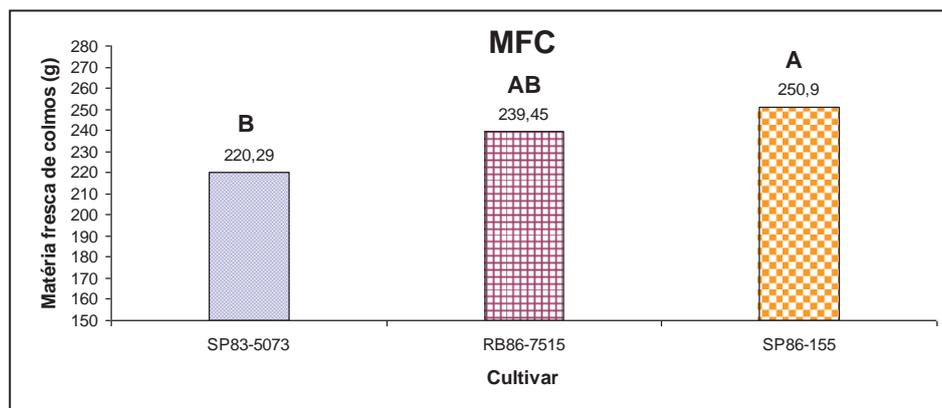
Com relação a MFFB ao fator estresse, as plantas controle obtiveram a maior média significativa em relação às plantas sob supressão da rega (Figura 16C). Esses resultados estão em perfeita concordância com os resultados de porcentagem de poros do solo preenchidos com água (Figura 6A, 6B e 6C) evidenciando que as condições experimentais foram suficiente e adequada para o trabalho de déficit hídrico.

Na Figura 16D, pode se verificar que a RB86-7515 se destaca com uma maior média em relação às outras cultivares, e o contrário foi observado na SP86-155. Entre as épocas de coleta, podemos observar que a RB86-7515 se mantém com as maiores médias até na 3<sup>o</sup> época de coleta, ocorrendo uma redução significativa na 4<sup>o</sup> coleta. Essa redução também foi significativa para as outras cultivares. Na 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> épocas de coleta, as três cultivares mantiveram estatisticamente as mesmas médias.



**Figura 16.** Matéria fresca de folhas e bainhas. Efeito do fator cultivar (A). Efeito do fator coleta (B). Efeito do fator estresse (C). Efeito da interação cultivar x coleta (D). Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o parâmetro MFC, a melhor média foi verificada na SP86-155 e a RB86-7515 apresentou média intermediária, não diferindo estatisticamente das outras cultivares (Figura 17).



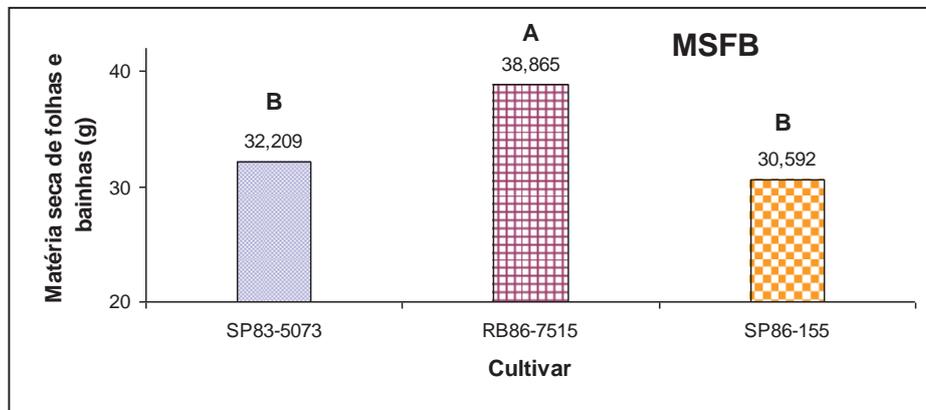
**Figura 17.** Efeito do fator cultivar sobre o parâmetro Matéria fresca de colmo. Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 5.4.5. Matéria Seca de Folhas, Bainhas e Colmos (MSFB – MSC)

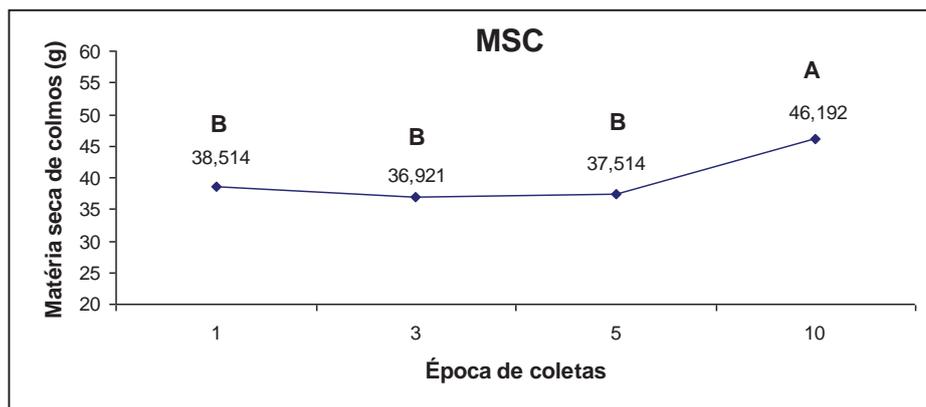
Na Tabela 5, podemos observar que para o parâmetro matéria seca de folhas e bainhas (MSFB) ocorreu efeito significativo promovido pelo fator cultivar. E para a massa seca do colmo (MSC) foi significativo para o fator coleta.

Para o fator cultivar, foi verificado a maior média na RB86-7515 e as outras cultivares não diferenciaram entre si para o parâmetro MSFB (Figura 18). Esses resultados estão de acordo com o obtido por MACHADO et al. (2009), ao verificarem que o clone IACSP 96-2042 foi o mais afetado pelo déficit, devido ao menor acúmulo de matéria seca no colmo sob baixa disponibilidade hídrica na fase inicial de crescimento das plantas. Segundo FERRO (2008) quanto mais desidratada estiver à planta, maior será a quantidade de matéria seca em relação ao peso fresco da mesma. Deste modo, PINCELLI (2010), verificou que a deficiência hídrica reduziu a massa de matéria seca da parte aérea nas quatro cultivares de cana-de-açúcar e ao comparar as cultivares constatou que as cultivares SP81-3250 e SP83-2847 foram tolerantes ao estresse hídrico por produzirem maiores massas de matéria seca da parte aérea e das raízes.

Com relação ao parâmetro MSC, foi verificada uma diferença significativa ocasionado pelo aumento da MSC na 4<sup>o</sup> coleta (Figura 19). Esses resultados estão de acordo com o obtido por OLIVEIRA et al. (2007) que ao avaliarem o desenvolvimento da área foliar de três cultivares de cana-de-açúcar, em condições de campo, para a produção de biomassa, verificaram que na fase final do experimento (497 DAP) o acúmulo de massa seca nas folhas manteve-se mais constante, enquanto que o acúmulo de massa seca nos colmos resultou em taxas maiores.



**Figura 18.** Matéria seca de folhas e bainhas. Efeito do fator Cultivar. Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 19.** Matéria seca de colmos. Efeito do fator Coleta. Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 5.5. Determinação do Teor de Prolina Livre

Os resultados obtidos por meio da análise estatística foram separados por época de coletas (Tabela 6).

**Tabela 6** – Resumo da análise de variância para a determinação do teor de prolina livre das cultivares de cana-de-açúcar tolerantes (SP86-5073 e RB86-7515) e sensível (SP83-155), ao estresse hídrico submetidas à 1, 3, 5 e 10 dias de supressão da rega.

Fatores	Valores de <i>F</i>			
	1 dia de supressão da rega	3 dias de supressão da rega	5 dias de supressão da rega	10 dias de supressão da rega
<b>Cultivar</b>	0.03 <sup>NS</sup>	10.30 <sup>**</sup>	82,74 <sup>***</sup>	0,52 <sup>NS</sup>
<b>Estresse</b>	0.57 <sup>NS</sup>	0,23 <sup>NS</sup>	121,18 <sup>***</sup>	432,78 <sup>***</sup>
<b>Interação Cultivar X Estresse</b>	0,24 <sup>NS</sup>	0,94 <sup>NS</sup>	67,86 <sup>***</sup>	2,95 <sup>**</sup>

<sup>NS</sup>Não significativo pelo teste *F*

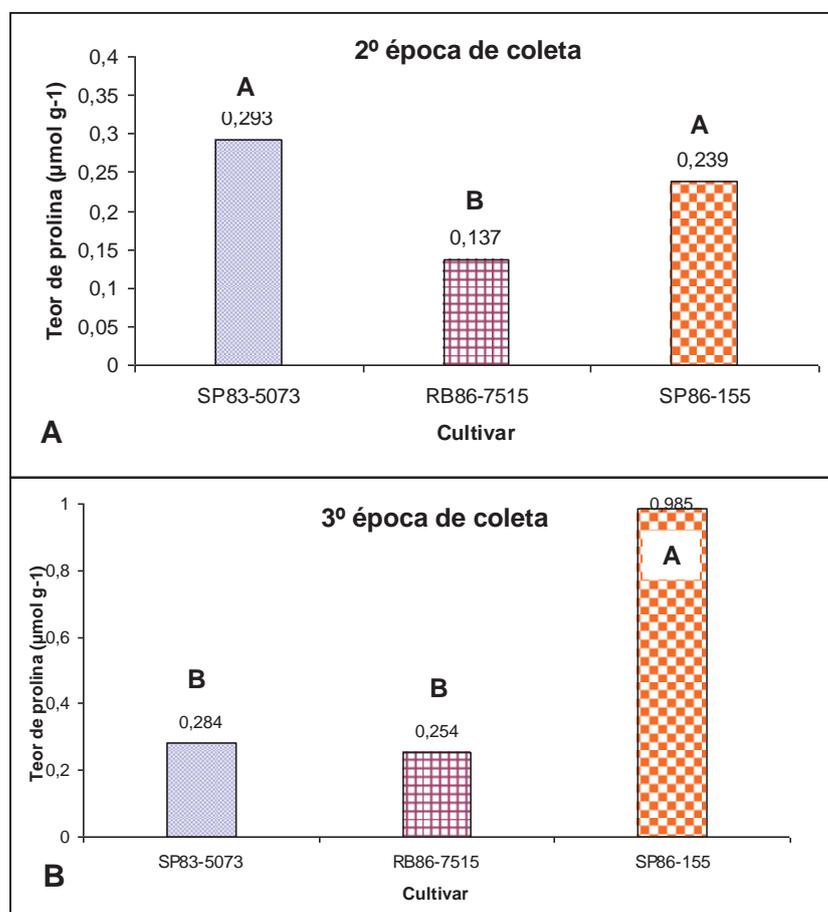
<sup>\*\*\*</sup>significativo ( $P < 0,001$ ) pelo teste *F*

<sup>\*\*</sup>significativo ( $P < 0,01$ ) pelo teste *F*

Na 1<sup>o</sup> coleta, não foi estatisticamente significativo para os fatores cultivar, estresse e para a interação cultivar x estresse.

Para a 2<sup>o</sup> coleta, o teor de prolina livre foi significativo apenas para o fator cultivar, onde as maiores médias foram verificadas nas cultivares SP83-5073 e SP86-155 (Figura 20A). Esse resultado corrobora com o resultado obtido por GONÇALVES (2008) que estudando quatro variedades de cana-de-açúcar sob condições de estresse hídrico, em casa de vegetação, observou que a cultivar SP79-1011 considerada tolerante à seca, apresentou maiores valores de prolina.

No caso da 3<sup>o</sup> coleta, o teor de prolina livre foi significativo em todos os fatores. Para o fator cultivar, a SP86-155, sensível ao estresse hídrico, se destaca com a maior média e as outras cultivares não diferenciaram entre si (Figura 20B).

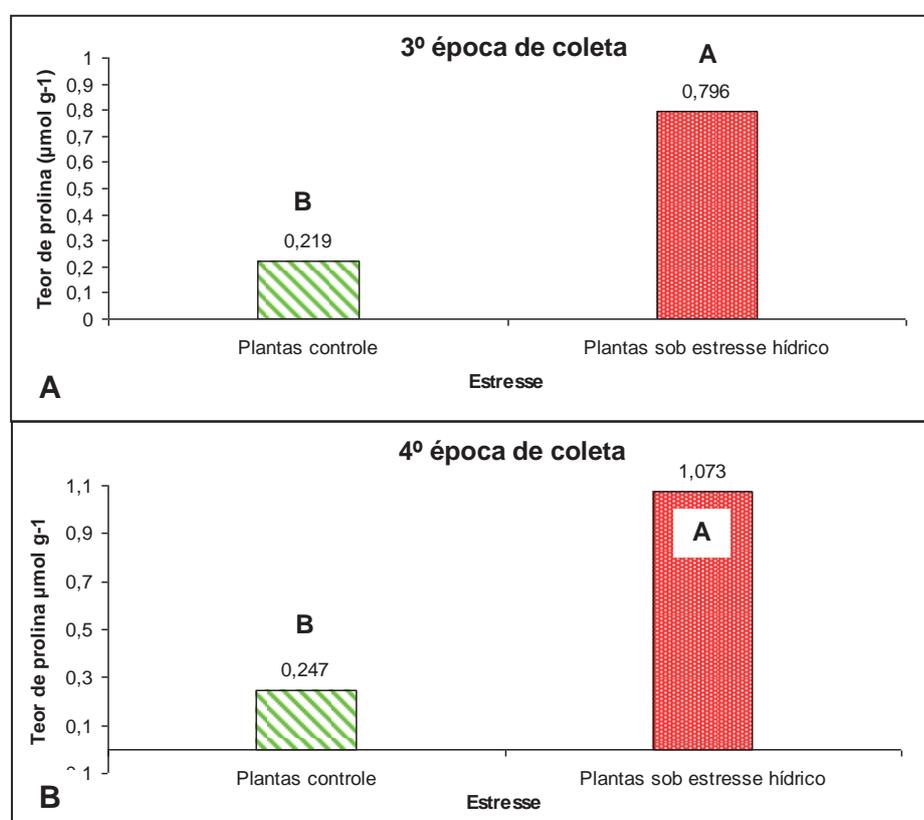


**Figura 20.** Teor de prolina livre. Efeito do fator Coleta na segunda época de coleta (3 dias sob estresse hídrico) (A), e na terceira época de coleta (5 dias sob estresse hídrico) (B). Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o fator estresse, ocorreu uma diferença significativa na 3ª e 4ª coleta, onde as plantas sob estresse hídrico tiveram uma melhor média quando comparadas com as plantas controle (Figura 21A e 21B). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por SILVA (2010), relata que talvez a prolina, dentre os solutos orgânicos, seja o primeiro a ter sua síntese e acúmulo mais pronunciado em função do estresse hídrico nas plantas.

Ao compararmos as duas figuras, observa-se que ocorreu um aumento no teor de prolina livre na 4ª coleta. Do mesmo modo, CARLIN & SANTOS (2009)

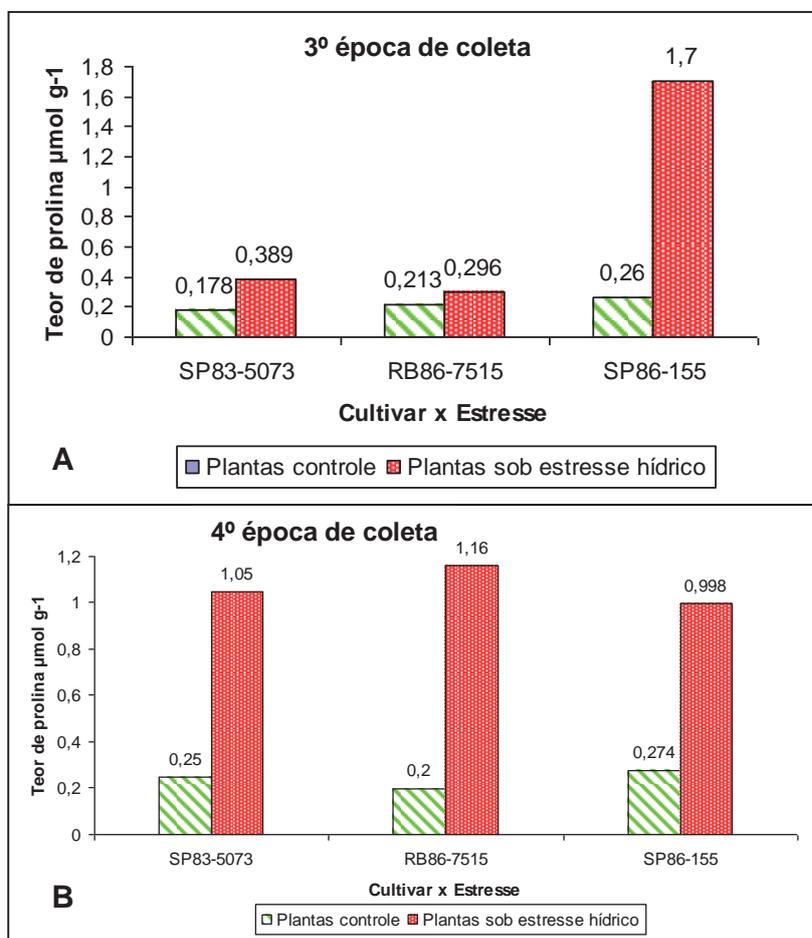
estudando o crescimento de plantas jovens de cana-de-açúcar sob o efeito da interação estresse hídrico e acidez do solo com alumínio, verificaram que a acidez no solo prejudica a absorção de água pelas plantas, ocasionando um estresse hídrico e um pequeno acúmulo de prolina, mas o maior valor foi verificado sem a presença do alumínio, indicando que esse aumento no teor de prolina está mais relacionado com a quantidade de água disponível do que o estresse causado pela presença do alumínio.



**Figura 21.** Teor de prolina livre. Efeito do fator Estresse na terceira época de coleta (5 dias sob estresse hídrico) (A), e na quarta época de coleta (10 dias sob estresse hídrico) (B). Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Figura 22A, na interação cultivar x estresse, foi observado que a cultivar SP86-155, considerada sensível ao estresse hídrico, apresentou a maior média do teor de prolina livre nas plantas submetidas ao estresse hídrico.

Já na quarta época de coleta (10 dias de supressão da rega), observa-se que todas as plantas das três cultivares submetidas ao estresse hídrico tiveram um aumento das médias em relação à coleta anterior, em destaque para a cultivar RB86-7515 que obteve a maior média (Figura 22B). Esses resultados estão de acordo com HARE et al. (1999), onde relatam que o acúmulo de prolina livre pode ser decorrente do decréscimo na degradação ou do aumento da biossíntese deste aminoácido. Do mesmo modo, RECCHIA (2011), sob condições de seca, o teor de prolina sofre aumento em suas concentrações para regular o ajustamento osmótico das plantas e assim reverter possíveis danos ao metabolismo celular. Ao compararmos as figuras 22A e 22B, podemos observar que na quarta coleta, a cultivar SP86-155 apresentou um decréscimo no teor de prolina. O mesmo foi observado por MAIA et al. (2007), que trabalhando com genótipos de milho, sob condições de campo, aos sete meses de cultivo, verificaram comportamento semelhante entre os genótipos, mas aos nove meses houve redução na síntese de prolina com a redução do conteúdo de água do solo. Esses autores relatam que as repostas ao estresse hídrico podem depender tanto da idade das plantas quanto das próprias variedades.



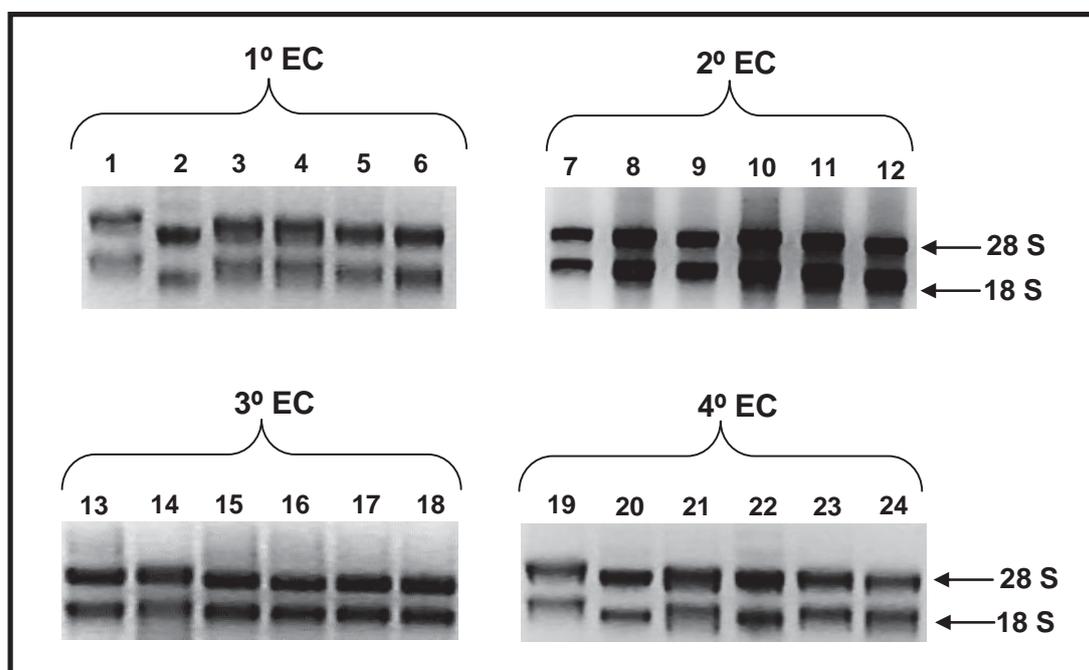
**Figura 22.** Teor de prolina livre. Efeito da interação Cultivar x Estresse na terceira época de coleta (5 dias sob estresse hídrico) (A), e na quarta época de coleta (10 dias sob estresse hídrico) (B). Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 5.6. Extração de RNA total de Palmitos de Cana-de-Açúcar

### 5.6.1. Integridade e Pureza do RNA.

No perfil eletroforético do RNA total das amostras de palmito de cana-de-açúcar em gel de agarose 1,5 % (p/v) desnaturante (contendo formaldeído) foram visualizadas duas bandas dos RNAs ribossômicos (rRNAs) 28 S e 18 S. Este perfil das amostras demonstra que o RNA está íntegro (Figura 23). Os resultados

obtidos na quantificação dos diferentes RNAs apresentaram densidade óptica ( $A^{260}/A_{280}$ ) em torno de 1,8 e 2,0 e a razão  $A_{260nm}/A_{230nm}$  apresentou valores próximos de 2,0 (resultados não apresentados). Soluções de RNA (ou DNA) de boa qualidade devem apresentar valor de  $A_{260nm}$  duas vezes maior que  $A_{280nm}$ , dando uma relação  $A_{260nm}/A_{280nm}$  igual a 2,0 (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS,1989). Sendo assim, soluções de RNA (ou DNA) que apresentem valores entre 1,8 e 2,0 são consideradas livres de proteína e de outros contaminantes. Por essa razão, os RNAs extraídos e utilizados nos experimentos estavam íntegros e puros.



**Figura 23.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 %. 1,0 µg de RNA total extraído do *pool* de palmito das quatro replicatas biológicas das três cultivares de cana-de-açúcar foram aplicados em cada linha do gel. **Linha 1-2; 7-8; 13-14 e 19-20:** representam as amostras da cv SP83-5073 e cada par de números referem-se às amostras da planta-controle (sob adequado suprimento de água) e planta sob estresse hídrico, respectivamente; **Linha 3-4; 9-10; 15-16 e 21-22:** representam as amostras da cv RB86-7515 e cada par de números referem-se às amostras da planta-controle e planta sob estresse hídrico, respectivamente; **Linha 5-6; 11-12; 17-18 e 23-24:** representam as amostras da cv SP86-155 e cada par de números referem-se às amostras da planta-controle e planta sob estresse hídrico, respectivamente. Estão indicadas as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais, 28 S e 18 S. **EC** – Época de Coleta (1º, 2º, 3º e 4º correspondem a 1, 3, 5 e 10 dias de supressão da rega, respectivamente).

## **5.7. Técnica de cDNA-AFLP**

### **5.7.1. Identificação e recuperação dos fragmentos expressos**

Das 12 combinações de primers seletivos EcoRI/MseI, apenas duas não geraram padrão de fragmentos expressos, provavelmente por não permitirem uma amplificação adequada. Em média, as combinações de iniciadores utilizados nas cultivares tolerantes ao estresse hídrico geraram padrões de fragmentos que variaram de 80 a 890 pb. O tamanho molecular dos fragmentos que foram excisados do gel foi estimado recorrendo à equação de regressão linear construída baseando-se na migração dos padrões de tamanho molecular utilizados. É importante ressaltar que tal método se trata de uma extrapolação e, portanto, os valores estimados de tamanho molecular não são precisos. De qualquer forma, o método revelou-se de grande eficácia para a estimativa do tamanho dos fragmentos, visto que o valor estimado apresentou, para a maioria dos fragmentos expressos, correspondência com o tamanho molecular determinado pelo posterior sequenciamento dos fragmentos. DEDEMO (2011), utilizando essa mesma técnica verificou em seus resultados que a metodologia de regressão linear foi de grande eficácia para a estimativa de seus fragmentos. Na Figura 24, podemos observar um exemplo de padrão de fragmentos detectados pela técnica de cDNA-AFLP.

Nas 10 combinações restantes, foram observados, por meio da análise visual, 1.077 padrões de fragmentos de cDNA-AFLP, onde foram considerados Fragmentos Expressos (FEs), aqueles identificados pela ausência do fragmento na cultivar sensível ao estresse hídrico quando submetida à supressão da rega e Fragmentos Exclusivos expressos nas cultivares Tolerantes (FE-Ts) desde que ausentes em suas planta-controle.

Para a cv SP83-5073, foram observados 463 FEs, sendo 170 FEs nas plantas sob estresse hídrico e 18 FEs-T (Tabela 7). Para a cultivar RB86-7515 foram observados 614 FEs, onde 283 FEs nas plantas sob supressão da rega e 30 FEs-T (Tabela 8). As plantas-controle (que não foram submetidos à supressão

da rega) apresentaram o maior número de FEs (293 e 331) para as cultivares SP83-5073 e RB86-7515, respectivamente (Tabelas 7 e 8).

Foram recuperados do gel de poliacrilamida, um total de 453 fragmentos expressos nas plantas sob déficit hídrico nas duas cultivares, ao passo que, 48 desses fragmentos foram expressos exclusivamente nas cultivares tolerantes (FEs-T). Logo após, os fragmentos foram eluídos em tampão TE.



**Tabela 7** - Análise de cDNA-AFLP com 10 combinações de *primers* seletivos *EcoRI*-*MseI* referente a cultivar tolerante à seca **SP83-5073**. São apresentados os números de fragmentos expressos (FEs) e os fragmentos exclusivos (FEs-T) nas cv de cana-de-açúcar controle e estressada em cada época de coleta (EC).

SP83-5073						
Combinação <i>Primers</i> <i>EcoRI</i> / <i>MseI</i>	EC	Nº FEs plantas- controle	Nº FEs plantas sob estresse hídrico	Nº Total FEs	Nº FEs-T plantas sob estresse hídrico	Nº Total FEs-T plantas sob estresse hídrico
B1 (ACT – CTG)	1 <sup>a</sup>	1	2	3	1	3
	2 <sup>a</sup>	13	3	16	1	
	3 <sup>a</sup>	1	0	1	0	
	4 <sup>a</sup>	7	8	15	1	
C1 (ACT – CTT)	1 <sup>a</sup>	8	11	19	3	8
	2 <sup>a</sup>	5	6	11	4	
	3 <sup>a</sup>	4	5	9	1	
	4 <sup>a</sup>	7	7	14	0	
C2 (ACT – CAA)	1 <sup>a</sup>	7	7	14	0	7
	2 <sup>a</sup>	10	7	17	2	
	3 <sup>a</sup>	6	8	14	5	
	4 <sup>a</sup>	4	4	8	0	
H1 (ACG – CTG)	1 <sup>a</sup>	3	3	6	0	0
	2 <sup>a</sup>	9	3	12	0	
	3 <sup>a</sup>	0	0	0	0	
	4 <sup>a</sup>	6	6	12	0	
B (ACA – CAG)	1 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0
	2 <sup>a</sup>	0	0	0	0	
	3 <sup>a</sup>	3	1	4	0	
	4 <sup>a</sup>	0	0	0	0	

---

**Continuação**


---



---

**SP83-5073**


---

Combinação <i>Primers</i> EcoRI/ MseI	E	Nº FEs C plantas- controle	Nº FEs plantas sob estresse hídrico	Nº Total FEs	Nº FEs-T plantas sob estresse hídrico	Nº Total FEs- T plantas sob estresse hídrico
<b>E (ACC - CTG)</b>	1 <sup>a</sup>	0	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>
	2 <sup>a</sup>	1	1	<b>2</b>	0	
	3 <sup>a</sup>	2	1	<b>3</b>	0	
	4 <sup>a</sup>	2	0	<b>2</b>	0	
<b>G (AGC - CTC)</b>	1 <sup>a</sup>	0	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>
	2 <sup>a</sup>	0	0	<b>0</b>	0	
	3 <sup>a</sup>	0	0	<b>0</b>	0	
	4 <sup>a</sup>	0	0	<b>0</b>	0	
<b>H2 (AAC - CTG)</b>	1 <sup>a</sup>	14	14	<b>28</b>	0	<b>0</b>
	2 <sup>a</sup>	11	0	<b>11</b>	0	
	3 <sup>a</sup>	5	0	<b>5</b>	0	
	4 <sup>a</sup>	33	10	<b>43</b>	0	
<b>G2 (ACC - CAT)</b>	1 <sup>a</sup>	15	22	<b>37</b>	0	<b>0</b>
	2 <sup>a</sup>	6	1	<b>7</b>	0	
	3 <sup>a</sup>	11	0	<b>11</b>	0	
	4 <sup>a</sup>	60	22	<b>82</b>	0	
<b>F1 (AAG - CTC)</b>	1 <sup>a</sup>	1	1	<b>2</b>	0	<b>0</b>
	2 <sup>a</sup>	3	0	<b>3</b>	0	
	3 <sup>a</sup>	1	0	<b>1</b>	0	
	4 <sup>a</sup>	41	19	<b>60</b>	0	

---

**No Total de FEs e FEs-T obtidos com as 10 combinações - 463**
**No Total de FEs na cv controle obtidos com as 10 combinações - 293**
**No Total de FEs na cv estressada obtidos com as 10 combinações - 170**
**No Total de FEs-T na plantas sob estresse hídrico obtidos com as 10 combinações - 18**
**EC = (Época de Coleta): 1<sup>a</sup> = 1 dia; 2<sup>a</sup> = 3 dias; 3<sup>a</sup> = 5 dias e 4<sup>a</sup> = 10 dias de supressão da rega**


---

**Tabela 8** - Análise de cDNA-AFLP com 10 combinações de *primers* seletivos *EcoRI*-*MseI* referente a cultivar tolerante à seca **RB86-7515**. São apresentados os números de fragmentos expressos (FEs) e os fragmentos exclusivos (FEs-T) nas cv de cana-de-açúcar controle e estressada em cada época de coleta (EC).

Combinação <i>Primers</i> <i>EcoRI</i> / <i>MseI</i>	RB86-7515					
	EC	Nº FEs plantas controle	Nº FEs plantas estressada	Nº Total FEs	Nº FEs-T plantas estressadas	Nº Total FEs-T plantas estressadas
<b>B1 (ACT – CTG)</b>	1 <sup>a</sup>	14	1	15	0	4
	2 <sup>a</sup>	16	20	36	4	
	3 <sup>a</sup>	3	2	5	0	
	4 <sup>a</sup>	12	0	12	0	
<b>C1 (ACT – CTT)</b>	1 <sup>a</sup>	11	4	15	1	3
	2 <sup>a</sup>	6	4	10	1	
	3 <sup>a</sup>	3	4	7	1	
	4 <sup>a</sup>	9	0	9	0	
<b>C2 (ACT – CAA)</b>	1 <sup>a</sup>	5	5	10	2	6
	2 <sup>a</sup>	7	5	12	2	
	3 <sup>a</sup>	4	8	12	2	
	4 <sup>a</sup>	5	5	10	0	
<b>H1 (ACG – CTG)</b>	1 <sup>a</sup>	10	1	11	0	3
	2 <sup>a</sup>	6	9	15	3	
	3 <sup>a</sup>	1	1	2	0	
	4 <sup>a</sup>	0	0	0	0	
<b>B (ACA – CAG)</b>	1 <sup>a</sup>	8	3	11	0	2
	2 <sup>a</sup>	5	7	12	2	
	3 <sup>a</sup>	1	1	2	0	
	4 <sup>a</sup>	3	1	4	0	

<b>Continuação</b>						
<b>RB86-7515</b>						
<b>Combinação Primers EcoRI/ MseI</b>	<b>EC</b>	<b>Nº FEs plantas controle</b>	<b>Nº FEs plantas estressada</b>	<b>Nº Total FEs</b>	<b>Nº FEs-T plantas estressadas</b>	<b>Nº Total FEs- T plantas estressadas</b>
<b>E (ACC - CTG)</b>	1 <sup>a</sup>	1	0	1	0	<b>0</b>
	2 <sup>a</sup>	2	1	3	0	
	3 <sup>a</sup>	1	1	2	0	
	4 <sup>a</sup>	3	1	4	0	
<b>G (AGC - CTC)</b>	1 <sup>a</sup>	0	0	0	0	<b>0</b>
	2 <sup>a</sup>	4	4	8	0	
	3 <sup>a</sup>	0	0	0	0	
	4 <sup>a</sup>	4	4	8	0	
<b>H2 (AAC - CTG)</b>	1 <sup>a</sup>	6	6	12	0	<b>0</b>
	2 <sup>a</sup>	4	4	8	0	
	3 <sup>a</sup>	3	3	6	0	
	4 <sup>a</sup>	34	33	67	0	
<b>G2 (ACC - CAT)</b>	1 <sup>a</sup>	22	21	43	0	<b>8</b>
	2 <sup>a</sup>	1	8	9	7	
	3 <sup>a</sup>	8	5	13	1	
	4 <sup>a</sup>	51	51	102	0	
<b>F1 (AAG - CTC)</b>	1 <sup>a</sup>	5	4	9	0	<b>4</b>
	2 <sup>a</sup>	4	7	11	4	
	3 <sup>a</sup>	1	1	2	0	
	4 <sup>a</sup>	48	48	96	0	

**No Total de FEs obtidos com as 10 combinações - 614**  
**No Total de FEs nas plantas-controle obtidos com as 10 combinações - 331**  
**No Total de FEs na plantas sob estresse hídrico obtidos com as 10 combinações - 283**  
**No Total de FEs-T na plantas sob estresse hídrico obtidos com as 10 combinações - 30**  
 EC = (Época de Coleta): 1<sup>a</sup> = 1 dia; 2<sup>a</sup> = 3 dias; 3<sup>a</sup> = 5 dias e 4<sup>a</sup> = 10 dias de supressão da rega

Ao comparar o padrão de expressão dos fragmentos de cDNA-AFLP entre as duas cultivares de cana-de-açúcar tolerantes ao estresse hídrico podemos verificar que a cv RB86-7515 expressou o maior número de FEs, tanto nas plantas controle como nas plantas sob estresse hídrico e também foi observado um maior número de FEs-T. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por DEDEMO (2011), que ao realizar a identificação de genes diferencialmente expressos, por meio da técnica de cDNA-AFLP e suas sequências de DNA, em folhas de cana-de-açúcar das mesmas cultivares e tratamento experimental utilizadas neste trabalho constatou que as plantas controle expressaram um maior número de fragmentos quando comparados com as cultivares submetidas a supressão da

rega, sugerindo que os transcritos possam estar sujeitos à modulação da expressão pelo estresse. Em gel de poliacrilamida 6%, também foi possível verificar que a cv RB86-7517 gerou 56 FDTs-DE a mais que a cv SP83-5073. Convém ressaltar que o critério de escolha dos FEs foi baseado na análise visual, onde foram escolhidos os fragmentos com padrão de bandas mais definidas no gel de poliacrilamida 6%.

### **5.7.2. Re-amplificação dos Fragmentos Exclusivos nas cultivares Tolerantes (FEs-T).**

Primeiramente, foram realizadas as reamplificações de 18 FEs-T oriundos das combinações ACT-CTG e ACT-CTT, sendo 11 FEs-T pertencentes à cv RB86-7515 e 7 FEs-T a cv SP83-5073. Para verificar a presença de bandas e o tamanho molecular de cada fragmento, foi realizada uma análise no gel de agarose 1 % (p/v).

Após a reamplificação desses fragmentos, foram realizadas novas reamplificações com os FEs-T restantes, onde após a realização das leituras de absorbância, verificação em gel de agarose 1% e purificação dos produtos de amplificação, não foi possível clonar nenhum outro fragmento.

Varias metodologias foram testadas na tentativa de reamplificar e retirar o DNA do gel de poliacrilamida. Segundo KOO & JAYKUS (2000), os contaminantes de PCR de géis de poliacrilamida co-elui com o DNA, prejudicando a reamplificação desses fragmentos. O mesmo foi observado por MOTA & OLIVEIRA (2008), que não conseguiram reamplificar grande parte de seus fragmentos e relatam que esse insucesso pode ser devido a redução da quantidade de DNA ou a inibição da reação de amplificação pelos vestígios de ácido acético decorrente da coloração com nitrato de prata do gel de poliacrilamida.

Para obter novas reamplificações, seguiu-se a metodologia descrita por KOO & JAYKUS (2000), onde verificaram que a melhor maneira de eluição do

DNA é por temperatura ambiente, seguidas por várias diluições. Esses autores sugerem que os contaminantes são mais propensos a co-eluir em temperaturas elevadas do que em temperaturas mais baixas. Após as novas eluições, foi realizado novamente as reamplificações e todo os processos posteriores , mas novamente não foi possível clonar esses fragmentos.

### **5.7.3 Análise dos Fragmentos Expressos Exclusivamente nas Cultivares Tolerantes (FEs-T).**

Dos 18 FEs-T, nas duas cultivares tolerantes ao estresse hídrico, seis foram clonados e sequenciados com sucesso. Os FEs-T provenientes da cultivar SP83-5073 foram renomeados como SCWSC1\_78 e SCWSC1\_79 (*Sugarcane Water Stress Cultivar SP83-5073*) e os da cultivar RB86-7515 renomeados como SCWSC2\_31, SCWSC2\_32, SCWSC2\_44 e SCWSC2\_99 (*Sugarcane Water Stress Cultivar RB86-7515*).

Utilizando os programas *Phred* e *Phrap*, foi possível verificar a qualidade do conjunto de seqüências de cada fragmento, excluir aquelas de baixa qualidade e por meio da correção manual de eventuais equívocos no sequenciamento, foram obtidos *contigs* de 237, 116, 96, 97 e 292 pb. A seqüência dos contigs de cada um dos seis fragmentos está apresentada na Tabela 9.

Ao analisar as seqüências dos contigs, foi realizado o alinhamento, por meio da ferramenta BLAST, dos fragmentos SCWSC2\_31/ SCWSC2\_32 e SCWSC1\_78/SCWSC1\_79, por apresentarem o mesmo tamanho molecular e migrarem muito próximo no gel de poliacrilamida. O alinhamento dos contigs está ilustrado nas Figuras 25 e 26.

**Tabela 9.** Sequência de *contigs* dos FEs-T nas cultivares de cana-de-açúcar tolerantes (RB86-7515 e SP83-5073) ao estresse hídrico.

<b>Fragmento</b>	<b>Sequência de Nucleotídeos</b>
<b>RB86-7515</b>	
SCWSC2_31 237 pb	TGACTGCGTACCAATTCAGTCTCGATTTGGGCTTTTCTCGCTGCTGCTGC TGCTTGCTAAGAATGTTGGATAACAGTTGTTTCGCGTTGTAAAATGTGAGGTG CTAGCACCCCTGTTTCGTTTCGCTGGTTTATTGTGACTGAAAGTACTATTTCGC TGGTTTGTGAGAGAGAAAATATTCTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTA AGAATGTTGGATAACAGTTACTCAGGACTCATCA
SCWSC2_32 237 pb	TGACTGCGTACCAATTCAGTCTCGATTTGGGCTTTTCTCGCTGCTGCTGCTGC TGCTTGCTAAGAATGTTGGATAACAGTTGTTTCGCGTTGTAAAATGTGAGGTG CTAGCACCCCTGTTTCGTTTCGCTGGTTTATTGTGACTGAAAGTACTATTTCGC TGGTTTGTGAGAGAGAAAATATTCTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTA AGAATGTTGGATAACAGTTACTCAGGACTCATCA
SCWSC2_44 116 pb	TGATGAGTCCTGAGTAACTGTATGGATGTGGAGCTGATGCACTCTCTTGG CGTAAATGCCTACAGTTCTCCATATCATGGGCCAGAGTTCTTCCCAGTG AATTGGTACGCAGTCA
SCWSC2_99 292 pb	TGACTGCGTACCAATTCAGTCTGCAAGGGACGGTTCTGCTGAACTCCCGCTG CATGTTTGGAGCAACCTGTTTCGGAGTGACACCCAGAGGTCCCTCTGAT TGAAGTCAAATATATCAGTTTGCCTAAAGGAACCTATGCGAAGTTGAAGC CAGAAGGAGTTGGTTTTTCGGATCTCCCTAACCATAGAGCAGTCTTGA ACAGCACTCCGCAATCACGCAACACTATCTGAAAATGATAACCATTGTGGT GAACTATGGGCAACTGCAGTACAAGTTACTCAGGACTCATCA
<b>SP83-5073</b>	
SCWSC1_78 96 pb	TGACTGCGTACCAATTCAGTCTGCAAGTTACTCAGGACTCATCA GTGAAGAATATAAACAGTGGGGCTGCAAGTTACTCAGGACTCATCA
SCWSC1_79 97 pb	TGACTGCGTACCAATTCAGTCTGCAAGTTACTCAGGACTCATCA TGTGAAGAATATAAACAGTGGGGTTGCAAGTTACTCAGGACTCATCA

## Alinhamento

Score = 438 bits (237), Expect = 4e-128  
 Identities = 237/237 (100%), Gaps = 0/237 (0%)  
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1 TGACTGCGTACCAATTCAGTCTGCTCGATTTGGGCTTTTCTCGCTGCTGCTGCTGCTTGGCTA 60
      |||
Sbjct 1 TGACTGCGTACCAATTCAGTCTGCTCGATTTGGGCTTTTCTCGCTGCTGCTGCTGCTTGGCTA 60

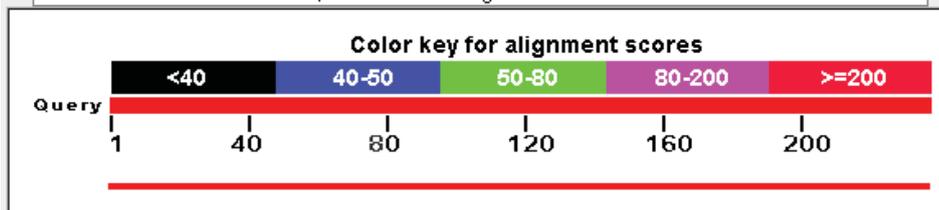
Query 61AGAATGTTGGATACAGTTGTTTCGCGTTGTAAAATGTGAGGTGCTAGCACCTGTTTCGTTT 120
      |||
Sbjct 61AGAATGTTGGATACAGTTGTTTCGCGTTGTAAAATGTGAGGTGCTAGCACCTGTTTCGTTT 120

Query 121CGCTGGTTTATTGTGACTGAAAGTACTATTTCGCTGGTTTGTGAGAGAAAAATATTCT 180
      |||
Sbjct 121CGCTGGTTTATTGTGACTGAAAGTACTATTTCGCTGGTTTGTGAGAGAAAAATATTCT 180

Query 181CgctgctgctgctgctgctgcttgetAAGAATGTTGGATACAGTTACTCAGGACTCATCA 237
      |||
Sbjct 181CGCTGCTGCTGCTGCTGCTTGTAAAGAATGTTGGATACAGTTACTCAGGACTCATCA 237
  
```

### Distribution of 2 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments



**Figura 25.** Alinhamento dos *contigs* dos fragmentos SCWSC2\_31 e SCWSC2\_32, ambos com 237 pb, utilizando a ferramenta Blast (NCBI).



mais próximo de zero, menor é a probabilidade de que o alinhamento tenha sido ao acaso, levando em consideração o tamanho do fragmento.

**Tabela 10.** Análise da similaridade dos contigs dos quatro FEs-T seqüenciados utilizando BlastX e BlastN.

FEs-T	EC	pb	ID	Gaps	Scores	E value	Descrição	Nova descrição
SCWSC2_31	2º	237	83/95 (87%)	3/95 (3%)	57	2e-20	gb AF029856.1  Sorghum bicolor cytochrome P450 CYP98A1	-
SCWSC2_44	2º	116	22/24 (92%)	0/24(0%)	131	5e-10	gb EES12507.1  hypothetical protein SORBIDRAFT_06g022510 [Sorghum bicolor]	beta-glucosidase
SCWSC1_79	1º	97	72/75 (96%)	1/75(1%)	65	7e-25	gb CA269256.1  SCBGR3072G08.g RT3 Saccharum hybrid cultivar SP80-3280 cDNA	Zea mays GAPC2 glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase mRNA
SCWSC2_99	2º	297	83/89 (93%)	0/89 (0%)	473	2e-59	gb EES00871.1  hypothetical protein SORBIDRAFT_03g023980 [Sorghum bicolor]	Atividade de DNA helicase

Na cultivar RB86-7515 foi verificado que o SCWSC2\_31 de 237 pb, mostrou homologia com a proteína Citocromo P450 de sorgo, com *E value* de  $2e-20$ , utilizando a ferramenta BlastN (Tabela 10).

As enzimas citocromo P450 são importantes reguladores do crescimento de plantas por catalisarem a síntese e degradação de hormônios de crescimento tais como geberelinas, auxinas e brassinoesteróides, além de outros hormônios como o Jasmonato e Ácido absísico (ABA). As reações catalisadas por estas enzimas são extremamente diversas, porém geralmente envolvem a transferência de seus átomos de oxigênio para um substrato e redução de outro átomo para formar água na presença de NADPH e NADP (REICHHARTA et al. 2002; COON, 2005). A atividade desta proteína tem sido desencadeada por interações entre plantas e insetos (SCHULER, 1996), estresse biótico com *Xanthomonas albilineans* e cana-de-açúcar (DABBAS, 2009), estresse hídrico (FERRO, 2008), magnésio, fungos e ferimento (FRANK et al. 1996). Esta enzima participa da via de biossíntese de metabólitos secundários como fenilpropanóides, flavanóides, alcalóides, lipídeos e lignina além de atuar na detoxificação de xenobióticos como, por exemplo, herbicidas (KIM & TSUKAYA, 2002).

Em resposta à diminuição do conteúdo de água, o ABA endógeno, presente em quantidade relativamente baixa, é redistribuído nos tecidos desidratados para proteger a planta, como no fechamento estomatal. Conseqüentemente, ocorre o aumento do conteúdo endógeno de ABA durante eventos de seca (REN et al., 2007). Os efeitos do ABA na fisiologia do estresse podem ativar as vias metabólicas dependentes de ABA em resposta ao estresse hídrico (RIERA et al., 2005; SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Um membro da família de citocromos P450 foi identificado como ABA 8'-hidroxilase, uma enzima que degrada ABA durante o embebecimento da semente e estresse por dessecação (KUSHIRO et al., 2004; SAITO et al., 2004). A atividade desta enzima é alta em plantas se recuperando de estresse abiótico como, por exemplo, estresse hídrico. Desta maneira, a concentração e respostas biológicas do hormônio ABA podem

ser afetadas pelas rotas de síntese e degradação em função de alterações ambientais (KIM & TSUKAYA, 2002).

FERRO (2008), utilizando a técnica de macroarranjo de cDNA, a fim de monitorar a expressão de genes em palmito de cana-de-açúcar submetida a 17 dias de estresse hídrico, identificou dois transcritos diferencialmente expressos com similaridade a membros da família de citocromos P450, sendo que um clone, SCJFRZ2030D03.g, apresentou perfil de indução ao longo do período de 17 dias de estresse enquanto o outro clone, SCCCRZ3003B05.g, apresentou perfil de inibição e repressão. Neste estudo, dois clones, SCWSC2\_4 e SCWSC2\_5 oriundos da cultivar intermediária, foram expressos no 3<sup>o</sup> dia de estresse e apresentaram similaridade com a enzima citocromo P450.

BASSON & DUBERY (2007), trabalhando com folhas de feijão submetidas a seis tratamentos com ácido 3,5-dichlorosalicylic (CC-SA) e 2,6 - ácido dichloroisonicotinic (DC-INA), por meio da técnica de diferencial display, identificaram a enzima citocromo P450 (CYP98A5) que apresentou homologia com p-coumarate 3-hydroxylase, descrito por SCHOCH et al. (2001) e NAIR et al. (2002) como a parte que falta no metabolismo de fenilpropanóides.

Muitos compostos envolvidos na indução de resposta de defesa são sintetizados na via biossintética de fenilpropanóides, incluindo lignina e fitoalexinas, cuja indução durante infecção por patógenos pode levar à polimerização da parede celular, barreira primária da resistência ao patógeno (DIXON & PAIVA, 1995). As ligninas são heteropolímeros fenólicos complexos da parede celular, associada com ambos os polissacarídeos e proteínas. Estes polímeros complexos concedem importante reforço e impermeabilização de paredes de células vegetais e, portanto, a lignina desempenha um papel fundamental no apoio mecânico e resistência a doenças em plantas superiores.

Recentemente, KIM & CHOI (2010), produziram plantas transgênicas de arroz superexpressando o ATCYP78A7, o qual codifica uma proteína de citocromo P450. A transformação das plantas com o gene de interesse foi realizada utilizando-se *Agrobacterium tumefaciens* com intuito de aumentar a resistência

das plantas ao estresse hídrico. As plantas foram submetidas a 10 dias de supressão de rega juntamente com as do tipo selvagens (controle). Após sete dias de tratamento, as plantas selvagens começaram a apresentar sintomas de morte aparente, contrastando com as plantas transgênicas. Após a reidratação, observou-se que as plantas selvagens não conseguiram se recuperar enquanto as plantas transgênicas voltaram ao seu estado normal, sugerindo que o gene da citocromo P450 conferiu resistência nas plantas transformadas, confirmando que o gene do citocromo P450 confere tolerância ao estresse em cana.

SOUZA (2011), estudando folhas de cana-de-açúcar da cultivar SP80-3280, submetidas a 30, 45, 60 e 75 dias de tratamento com CO<sub>2</sub>, observou uma menor expressão do gene da enzima Citocromo P450 aos 45 dias, sugerindo que as plantas em elevada concentração de CO<sub>2</sub>, diminuem o investimento no metabolismo secundário, isto se deve ao fato de ter intensificado o crescimento das plantas sob elevado CO<sub>2</sub>.

Na cultivar RB86-7515, foi expresso o fragmento SCWSC2\_44 de 116 pb que mostrou homologia com proteína hipotética de sorgo, sendo denominada de SORBIDRAFT\_06g022510, com *E value* de 5e-10 (Tabela 10). Esta proteína hipotética, de acordo com as anotações no *Gene Ontology* (GO), está envolvida no processo biológico de metabolismo de carboidrato com a função molecular de  $\beta$ -glucosidase.

A  $\beta$ -glucosidase (3.2.1.21) é um glicosil hidrolase que hidrolisa a ligação  $\beta$ -O-glicosídica no carbono anomérico de uma molécula de glicose no final de uma molécula de carboidrato ou glicosídeo. Essas enzimas são encontradas essencialmente em todos os organismos vivos e têm sido implicadas em uma diversidade de papéis, tais como a conversão de biomassa por microorganismos (FOWLER, 1993), ativação de compostos de defesa (POULTON, 1998; DUROUX, 1998), precursores da lignina (DHARMAWARDHANA et al., 1995), e intermediários metabólicos, liberando grupos de glicose a partir do bloqueio de glicosídeos inativos em plantas (BARLEBEN et al., 2005). Para

alcançar especificidade para estas funções diversas,  $\beta$ -glicosidases deve se ligar a uma grande variedade de agliconas, além da glicose do substrato.

A enzima  $\beta$ -glicosidase pertence a grande família glicosil hidrolase 1 e 3 (HENRISSAT, 1991), sendo essas famílias mais numerosas em plantas. A família 1, contém uma ampla gama de  $\beta$ -glicosidases, incluindo  $\beta$ -galactosidases,  $\beta$ -mannosidases, fosfo- $\beta$ -galactosidases, fosfo- $\beta$ -glicosidases, e thioglucosidases, além de  $\beta$ -glicosidases. Essas enzimas, apesar de sua alta similaridade de sequências, apresentam atividades diversas no metabolismo. (MIZUTANI et al. 2002; HENRISSAT, 1991; RAYCHAUDHURI & TIPTON, 2002).

Na cultivar SP86-5073 foi verificado o fragmento SCWSC1\_79 que apresentou similaridade com uma sequência de cDNA do genoma da cana-de-açúcar SCBGRT3072G08.g RT3 Saccharum hybrid cultivar SP80-3280, com *E value* de  $7e-25$  (Tabela 10). Foi realizada uma pesquisa no Gene Bank, utilizando o número de acesso e verificou-se que essa sequência possui similaridade com a proteína glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, com *E value* de  $8e-50$ .

Neste trabalho, foi verificado um gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase citosólico GPD (EC1.2.1.12), sendo essa uma enzima essencial na glicólise e gliconeogênese. A função do GPD, como um tetrâmero de subunidades idênticas, é converter o NAD + produto de fosforilação oxidativa dependente de gliceraldeído 3 fosfato para 1-3 bifosfoglicerato. Esta é uma das reações metabólicas mais importantes da via glicolítica (NIU et al., 1994; REDKAR et al., 1998, HIRANO et al., 1999). A enzima também cataliza a reação inversa.

Jeong et al. (2000) submeteram plantas de batatas, transgênicas e selvagens, ao estresse salino. As plantas que superexpressaram o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, isolado de um tipo de cogumelo comestível (GPD P. sajor-caju) foram altamente tolerantes ao estresse salino, enquanto que as plantas do tipo selvagem morreram após 10 dias de estresse. Esses autores sugerem que essa enzima pode funcionar como um mediador de resposta metabólica induzida por estresse e outras mudanças metabólicas integradas durante estresse biótico.

A partir desses resultados, JEONG et al. (2001) em um trabalho posterior, conseguiram obter plantas transgênicas de batata altamente resistente ao estresse salino superexpressando o gene GPD P. saior-caju. Por essa razão, esses autores confirmam que a superexpressão do gene GPD pode gerar plantas transgênicas de batata resistente ao estresse salino.

O fragmento SCWSC2\_99 de 297 pb, expresso na cultivar RB86-7515, há similaridade com a proteína hipotética de sorgo, sendo denominada de SORBIDRAFT\_03g023980, com *E value* de  $2e-59$  (Tabela 10). De acordo com as anotações no *Gene Ontology* (GO), esta proteína está envolvida na função molecular de atividade de DNA Helicase.

Uma das funções das hidrolase é ajudar a reparar áreas danificadas do DNA dupla fita, para que ocorra o processo de reparação (VASHISHT & TUTEJA, 2006).

Em 1976, foi descoberta a DNA helicase procariótica de *E. coli* e em 1978, foi descoberta em plantas de lírio. A partir daí, muitas mais foram isoladas e caracterizadas, incluindo pelo menos oito em plantas, que estão presentes nos núcleos, mitocôndrias e cloroplastos (TUTEJA, 2003).

Helicases são proteínas motoras que catalisam o desenrolamento do DNA duplex/RNA de uma maneira dependente de ATP e, assim, desempenham papel importante na maioria dos processos genéticos básicos, incluindo replicação, reparo, recombinação, transcrição e tradução (TUTEJA & TUTEJA, 2004; MATSON et al. 2001).

SONG (2005), verificou em plantas de soja, que a DNA helicase mitocondrial foi ativa entre 100-200 nM de NaCl, e acima dessa concentração, a atividade dessa enzima foi inibida. Além disso, a temperatura elevada, acima de 50 °C, também inibiu a atividade da enzima, sendo que a temperatura ótima foi de 30 °C, 37 °C e 42 °C.

LIU et al. (2008), isolaram um gene de resistência ao estresse salino de *Apocynum venetume*, denominado de AvDH1 cujo produto gênico prediz uma proteína da família de DNA helicase.

Durante o seu ciclo de vida, muitos organismos são confrontados com numerosos estresses ambientais que podem afetar a sua sobrevivência, e conseqüentemente, muitos genes que respondem ao estresse por seca, salinidade, alta e baixa temperatura tem sido estudados (ISHITANI et al., 1998; SHINWARI et al., 1998), mostrando que esses genes estão envolvidos na função de proteger a célula contra os estresses (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997).

Diante disso foi possível identificar neste trabalho fragmentos de cDNA cuja as sequências, quando comparadas com banco de dados, mostram-se similares a enzimas que estão envolvidas com funções como: metabolismos secundários e ativação de mecanismos de defesa, metabolismo e armazenamento de substâncias químicas que podem ser hidrolizadas quando seu consumo se torna necessário, enzima que participa da glicólise e neoglicogenese, e uma enzima com atividade de reparo e manutenção que podem ajudar a planta a manter suas atividades mesmo em condições não favoráveis.

## VI. CONCLUSÕES

Considerando as condições em que o presente estudo foi desenvolvido na cultura da cana-de-açúcar e com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Para as análises biométricas, não houve diferença significativa na altura final das plantas entre as cultivares de cana-de-açúcar submetidas à supressão da rega, provavelmente devido ao tempo de supressão da rega.

- A cultivar tolerante: RB86-7515 obteve a maior média significativa para diâmetro do colmo, matéria fresca e seca de folhas e bainha e a cv SP86-155 para altura inicial, número de folhas e matéria fresca de colmo;

- O teor de prolina livre nos palmitos foi estatisticamente significativo a partir do terceiro dia de supressão da rega, onde foi verificada a maior média na cultivar RB86-7515, com 10 dias de supressão da rega;

- A técnica de cDNA-AFLP foi um método bem sucedido para a obtenção de 1.077 padrões de fragmentos diferencialmente expressos entre genótipos de cana-de-açúcar tolerantes (SP83-5073 e RB867515) e sensível à seca (SP86-155), submetidos a supressão da rega. Porém a taxa de eficiência para a identificação, ou seja, para a clonagem, foi baixa.

- A análise comparativa dos fragmentos derivados de transcrito diferencialmente expressos entre os genótipos tolerantes e sensível foi expressa em maior número nas plantas-controles.

- Foi verificado, na cultivar RB86-7515, maior número de fragmentos exclusivos expressos apenas nas cultivares tolerantes (FEs-T).

- Os FEs-T nas cultivares tolerantes, fornecem sequências candidatas que poderão ser posteriormente testadas para a verificação de sua relação com o caráter de tolerância apresentado pelas cultivares de cana-de-açúcar em que foram detectados.

## VII.Referências Bibliográficas

ADAMS, M. D.; KELLEY, J. M.; GOCAYNE, J. D.; DUBNICK, M.; POLYMEROPOULOS, M. H.; XIAO, H.; MERRIL, C. R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R. F.; KERLAVAGE, A. K.; McCOMBIE, W. R.; VENTER, J. C. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, Washington, v. 252, p. 1651-1656, 1991.

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

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

ALMEIDA, A. C. S.; SOUZA, J. L.; TEODORO, I.; BARBOSA, G. V. S.; MOURA FILHO, G.; FERREIRA JUNIOR, R. A. Desenvolvimento vegetativo e produção de variedades de cana-de-açúcar em relação à disponibilidade hídrica e unidades térmicas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p.1441-1448, 2008.

ANAMI, S.; DE BLOCK, M.; MACHUKA, J.; VAN LIJSEBETTENS, M. Molecular improvement of tropical maize for drought stress tolerance in Sub-Saharan Africa. **Critical reviews in plant sciences**, Boca Raton, v. 28, n. 1, p. 16-35, 2009.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.

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

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

BARBIERI, J. 30 anos do Proálcool no centro do debate. **JU - Jornal da Unicamp**, ed. 309, p.11, 2005. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/>>. Acesso em: 26 novembro 2010.

BARLEBEN, L, M. A. X.; KOEPKE, J.; PENG, G.; MICHEL, H.; STÖCKIGT J: Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of strictosidine glucosidase, an enzyme initiating biosynthetic pathways to a unique diversity of indole alkaloid skeletons. **Biochim Biophys Acta**, v. 1747, p. 89-92, 2005.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.24, n.1, p.23-58, 2005.

BASSON, A. E.; DUBERY, I. A. Identification of a cytochrome P450 cDNA (CYP98A5) from *Phaseolus vulgaris*, inducible by 3,5-dichlorosalicylic acid and 2,6-dichloro isonicotinic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 421—428, 2007.

BATES, L. S. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BIDOIA, M. A. P.; SANTOS, D. M. M.; MARIN, A.; LANDELL, M. G. A.; BANZATTO, D. A.; CAZETTA, J. O. **Efeito da deficiência hídrica no acúmulo de prolina livre em cana-de-açúcar , em diferentes períodos de desenvolvimento.** STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v. 24, n. 5, p. 6-9, 2006.

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

BORTOLAZZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo- ESALq, Piracicaba.

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

BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trend in Plants Science**, Kidlington, v. 2, p.48-54, 1997.

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**. . 3ª Impressão. 2000. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA, Cap.22, p.1158-1203.

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

CARLIN, S. D.; SANTOS, D. M. M. Indicadores fisiológicos da interação entre déficit hídrico e acidez do solo em cana-de-açúcar. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 44, n. 9, p. 1106-1113, 2009.

CONAB – Campanha nacional de abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira 2010/2011 – cana-de-açúcar**. Terceiro levantamento, jan 2011. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011. 17 p.

COON, M. J. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. **Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 1-25, 2005.

COPERSUCAR, Cooperativa de produtores de cana-de-açúcar, açúcar e álcool do Estado de São Paulo. Relatório Técnico Interno-RTB. Campinas: Centro de Tecnologia Canavieira, 1999. 32p. (Boletim Técnico).

CORREIA, K. G.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Avaliação do crescimento do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) submetido a déficit hídrico. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 4, n. 2, 7p, 2004.

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

CTC, Centro de Tecnologia Canavieira. Relatório Técnico Interno. Piracicaba: Centro de Tecnologia Canavieira, 2007. 20p. (Boletim Técnico).

DA SILVA, S.; SOARES, A. M.; DE OLIVEIRA, L. E. M.; MAGALHÃES, P. C. Respostas fisiológicas de gramíneas promissoras para revegetação ciliar de reservatórios hidrelétricos, submetidas à deficiência hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 124-133, 2001.

DABBAS, K. M. **Perfil de expressão gênica de cana-de-açúcar submetida ao estresse biótico com *Xanthomonas albilineans***. 2009. Tese (Doutorado em Microbiologia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal 2009.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, p.7-84, 1987.

DEDEMO, G. C. **Genes diferencialmente expressos entre cultivares de cana-de-açúcar tolerantes e sensível a seca submetidas ao estresse por deficiência hídrica**. 2011. 111f. Tese (Doutorado em Agronomia na área de Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

DELAUNEY, A.; VERMA, D. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **Plant Journal**, v. 4, p. 215-223, 1993.

DHARMAWARDHANA, D. P.; ELLIS, B. E.; CARLSON, J. E. A  $\beta$ -glucosidase from lodgepole pine specific for the lignin precursor coniferin. **Plant Physiol**, v. 107, p. 331-339, 1995.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n.12, p.6025-6030, 1996.

DINIZ, M. C. **Associação de marcadores (AFLP) com caracteres de interesse agrônomo em clones elite de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp)**. 2007. 104f.

Dissertação (Mestrado em Genética na área de Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, UFPE, Pernambuco.

DIXON, R. A; PAIVA; N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, 1995.

DONSON, J., FANG, Y., ESPIRITU-SANTO, G., XIONG, W., SALAZAR, A., MIYAMOTO, S., ARMENDAREZ, V., VOLKMUTH, W. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 75-97, 2002.

DUROUX, L.; DELMOTTE, F. M.; LANCELIN, J. M.; KERAVIS, G.; JAY-ALLEAND, C. Insight into naphthoquinone metabolism:  $\beta$ -glucosidase-catalysed hydrolysis of hydrojuglone  $\beta$ -D-glucopyranoside. **Biochem J**, v. 333, p. 275-283, 1998.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Fenologia da Cana-de-açúcar**. Disponível em: < [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_68\\_22122006154840.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_68_22122006154840.html)>. Acesso em: 16 fevereiro 2011.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Variedades de cana-de-açúcar**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_42\\_1110200717570.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html)>. Acesso em: 16 fevereiro 2011.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p.186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER L.; WENDL M. C.; GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p.175-185, 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FERRO, M. I. T. **Estudo do estresse hídrico em cana-de-açúcar utilizando genômica funcional**. 2008. 186 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

FILHO, J. A. D.; COSTA, M. G. S.; BASTOS, G. Q. B.; RESENDE, L. V.; MELO, J. O. T.; ANDRADE, J. S. C. O.; SILVA JÚNIOR, J. R. **Avaliação agronômica e divergência genética em famílias de cana-de-açúcar**. In: IX JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 19 a 23 de out 2009, Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

FLEXAS, J.; RIBAS-CARBO, M.; BOTA, J.; GALMES, J.; HENKLE, M.; MARTINEZ-CANELLAS, S.; MEDRANO, H. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. **New Phytologist**, v. 172, p. 73-82, 2006.

FOWLER, T. **Deletion of the *Trichoderma reesei*  $\beta$ -glucosidase gene, *bgl1***. In  *$\beta$ -glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology* Edited by: Esen A. Washington DC: American Chemical Society, p. 56-65, 1993.

FRANK, M. R., DEYNEKA, J. M.; SCHULER, M.A. Cloning of Wound-Induced Cytochrome P450 Monooxygenases Expressed in Pea. **Plant Physiol.**, v. 110, p.1035-1046, 1996.

GASCHO, G. J. Water-sugarcane relationships. **Sugar Journal**, New Orleans, v. 48, n. 6, p. 11-17, 1985.

GASCHO, G. J.; SHIH, S. F. Sugar cane. In: Teare I.D. and Peet M.M. (Eds.). **Crop-water relations**. 1.ed. New York: Wiley-Interscience, 1983. p.445-479.

GONÇALVES, E. R. **Fotossíntese, osmorregulação e crescimento inicial de quatro variedades de cana-de-açúcar submetida à deficiência hídrica**. 2008. 66p. Dissertação de Mestrado- UFAL, Brasil, 2008.

GRAÇA, J. P.; RODRIGUES, F. A.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ZINGARETTI, S. M. Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. Brazilian society of plant physiology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 3, p.189-197, 2010.

GREEN, P. **PHRAD documentation**. 1996. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>>. Acesso em: 28/03/2011.

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

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany** v. 50, p. 413-434, 1999.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem J**, v. 280, p. 309-316, 1991.

HIRANO, T.; SATO, T.; OKAWA, K.; KANDA, K. Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Lentinus edodes*. **Bioscience Biotechnology Biochem**, v. 63, n. 7, p.1223-1227, 1999.

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

INMAN-BAMBER, N. G. Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. **Field Crops Research**, Ontario, v. 89, n. 1, p. 107-122, 2004.

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

ISHITANI, M.; XIONG, L.; LEE, H.; STEVENSON, B.; ZHU, J.K. HOSI, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 10, p. 1151-1161, 1998.

JEONG, M. J.; PARK, S. C.; BYUN, M. O. Improvement of Salt Tolerance in Transgenic Potato Plants by Glyceraldehyde-3 Phosphate Dehydrogenase Gene Transfer. **Mol. Cells**, v. 12, n. 2, p. 185-189, 2001.

JEONG, M. J.; PARK, S. C.; KWON, H. B.; BYUN, M. O. Isolation and characterization of the gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.278, p.192-196, 2000.

JOVINO, D. F. R. **Expressão gênica diferencial em palmitos de cana-de-açúcar submetida a diferentes períodos de estresse hídrico**. 2007. 81f. Dissertação (Mestrado em Agronomia na área de Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

JUNIOR, J. A. S. R. **Influência dos estressores bióticos *diatraea saccharalis* (fabr.) (lepidoptera: crambidae) e *Mahanarva fimbriolata* (stål) (hemiptera: cercopidae) na produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar**. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Agronomia na Área de Entomologia Agrícola) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

JUNIOR, R. A. F. **Crescimento de variedades RB de cana-de-açúcar irrigadas e fotossíntese modelada pela radiação solar**. 2010. 68f. Dissertação (mestrado em agronomia na área de produção vegetal) - Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, Alagoas.

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.

KIM, G. T.; TSUKAYA, H. Regulation of the biosynthesis of plant hormones by cytochrome P450s. **J. Plant Res**, v.115, p.169–177, 2002.

KIM, H. B.; CHOI, S. B. Cytocrome P450 gene for increasing seed size or water stress resistance of plant. **PAteente Application Publication**. Pub. n.US2010/0281576A1, 2010.

KIVIOJA, T.; ARVAS, M.; SALOHEIMO, M.; PENTTILÄ, M.; UKKONEN, E. Optimization of cDNA-AFLP experiments using genomic sequence data. **Bioinformatics**, v. 21, n. 11, p. 2573–2579, 2005.

KOO, K.; JAYKUS, L. Methods for avoiding PCR-inhibiting contaminants when eluting DNA from polyacrylamide gels. **BioTechniques**, v. 29, p. 694-696, 2000.

KUSHIRO, T.; OKAMOTO, M.; NAKABAYASHI, K.; YAMAGISHI, K.; KITAMURA, S.; ASAMI, T.; HIRAI, N.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, KAMIYA, Y.; NAMBARA, E. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. **The Embo Journal**, Oxford, v. 23, n. 7, p.1647–1656, 2004.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; GROF, C. L. P.; BONNETT, G. D.; SMITH, G. R. Sugarcane Biotechnology: The Challenges And Opportunities. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.** v. 41, p. 345–363, 2005.

LAM, E.; SHINE, JR.; DA SILVA, J.; LAWTON, M.; BONOS, S.; CALVINO, M.; CARRER, H.; SILVA-FILO, M. C.; GLYNN, N.; HELSEL, Z.; MA, J. ; RICHARD JR, E.; SOUZA, G. M.; MING, R. Improving sugarcane for biofuel:engineering for na even better feedstock. **Global Change Newsletter**, Stockholm, v. 1, p. 251-255, 2009.

LAMB, C. R. C. **Identificação de genes envolvidos na interação entre *Magnaporthe grisea* e arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2006. 161f. Tese (Doutorado em Fitotecnia na Area de Concentração Fitossanidade) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa Artes e Textos, 2004, 531p.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant and Cell Environment**, v. 25, p. 275-294, 2002.

LAXALT, A. M.; CASSIA, R. O.; SANLLORENTI, P. M.; MADRID, E. A.; ANDREAU, A. B.; DALEO, G. R.; CONDE, R. D.; LAMATTINA, L. Accumulation of cytosolic glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions an elicitor treatments in potato. *Plant Mol. Biol.*, v.30, p.961-972, 1996.

LIANG, P.; PARDEE, A. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 257, p. 967-971, 1992.

LIU, H. H.; LIU, J.; FAN, S. L.; SONG, M. Z.; HAN, X. L.; LIU, F.; SHEN, F. F. Molecular cloning and characterization of a salinity stress-induced gene encoding DEAD-box helicase from the halophyte *Apocynum venetum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 3, p. 633–644, 2008.

LUO, Y; LIU, Y. B.; DONG, Y. X.; XIN-QI, G., ZHANG, X. S. Expression of a putative alfalfa helicase in creases tolerance to a biotic stressin Arabidopsis by enhancing the capacities for ROSs cavenging and osmotica djustment. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 385—394, 2009.

MACHADO, R. S.; RIBEIRO, R. V.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, D. F. S. P.; MACHADO, E. C.; LANDELL, M. G. A. Respostas biométricas e fi siológicas ao defi cit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1575-1582, 2009.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 139–158, 2005.

MAIA, P. S. P.; OLIVEIRA NETO, C. F.; CASTRO, D. S.; FREITAS, J. M. N.; LOBATO, A. K. S.; DA COSTA, R. C. L. Conteúdo relativo de água, teor de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas de duas cultivares de milho submetidas a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 918-920, 2007.

MANNERS, J. M.; CASU, R. E. Transcriptome analysis and functional genomics of sugarcane. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 9–21, 2011.

MANSOUR, M. M. F. Protection os plasma membrane of onion epidermal cells by glycine betaine and proline against NaCl stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Iss les Molineaux, v. 36, n. 10, p.767-772, 1998.

MARIN, F. R.; PELLEGRINO, G. Q.; ASSAD, E. D.; PINTO, H. S.; ZULLO JUNIOR, J. Cana de açúcar. In: MONTEIRO, J.E.B.A. (Ed). **Agrometeorologia dos cultivos: o fator meteorológico na produção agrícola**. Brasília: INMET, 2009, p. 111-130.

MARTINS, N. G. S. **Os Fosfatos na Cana-de-Açúcar**. 2004. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, Piracicaba, Esalq/USP, São Paulo.

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

MENOSSE, M.; SILVA-FILHO, M. C.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M. A.; SOUZA, G. M.; Sugarcane Functional Genomics: Gene Discovery for agronomic Trait Development. **International Journal of Plant Genomics**. Review Article, 11 p. 2008.

MIZUTANI, M.; NAKANISHI, H.; EMA, J.; MA, S.; NOGUCHI, E.; INOHARA-OCHIAI M.; FUKUCHI-MIZUTANI, M.; NAKAO, M.; SAKATA, K. Cloning of  $\beta$ -primeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation. **Plant Physiology**, v. 130, p. 2164-2176, 2002.

MOLINARI, H. B. C. **Expressão Estresse-Induzida do Gene *P5CS* em Plantas transgênicas de Cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico**. 2006. 124f. Tese (Doutorado em Agronomia na área de Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MOTA, M.; OLIVEIRA, C. M. Identificação de genes expressos durante a interação cv. Florina - V. inaequalis por Differential Display-RT-PCR. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p.139-147, 2008.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239-250, 2002.

NAIR, R. B.; XIA, Q.; KARTHA, C. J.; KURYLO, E.; HIRJI, R.N.; DATLA, R.; SELVARAJ, G. Arabidopsis CYP98A3 mediating aromatic 3- hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast. **Plant Physiol**, v. 130, p. 210-220, 2002.

NASSIF, D. S. P. **Parametrização e avaliação do modelo DSSAT/CANEGRO para variedades brasileiras de cana-de-açúcar**. 2010 92 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências na Área de Física do Ambiente Agrícola) – Universidade de São Paulo – ESALq, Piracicaba.

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 23, p. 12-18, 2001.

NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L. Water management. *In* FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Tropical soybean: Improvement and production. **FAO - Plant Production and Protection Series**, 27, Rome, Italy, p. 153-160, 1994.

NIU, X.; WANG, H.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Molecular cloning and expression of a glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene in desert halophyte, *Atriplex rummularia* L. **Plant Physiology**, v. 104, p. 1105-1106, 1994.

NÓBREGAS, J. C. M.; DORNELAS, M. C. Biotecnologia e melhoramento da cana-de-açúcar. *In*: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E. et al., **Atualização em produção em cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livros Ceres, 2006. p. 39-56.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; ALBUQUERQUE, M. B.; SILVA, E. C. Aspectos ecofisiológicos da tolerância à seca em plantas da caatinga. *In*. NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. (Ed.). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária . 2005. p. 22-31.

OLIVA, M. A.; BARROS, N. F.; GOMES, M. M. S.; LOPES, N. F. Seca de ponteiros em *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. em relação a estresse hídrico e nutrição mineral. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 13, n. 1, p. 19-33, 1989.

OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E.; ZAMBON, J. L. C.; WEBER, H.; YDO, O. T.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; KOEHLER, H. S.; DA SILVA, D. K. T. Crescimento e desenvolvimento de três cultivares de cana-de-açúcar, em cana-planta, no Estado do Paraná. **Scientia Agraria**, v. 5, n. 1-2, p. 87-94, 2004.

OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E.; ZAMBON, J. L. C.; WEBER, W.; IDO, O. T.; BESPALHOK-FILHO, J.; ZUFFELLATO-RIBAS<sup>4</sup>, K. C.; DA SILVA, D. K. T. área foliar em três cultivares de cana-de-açúcar e sua correlação com a produção de biomassa. **Pesq Agropec Trop**, V. 37, n. 2, p. 71-76, 2007.

OSÓRIO, J. et al. Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 18, n. 6, p. 363-373, 1998.

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

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropédica: Edur, 2004. 191p.

PINCELLI, R. P. **Tolerância a deficiência hídrica em cultivares da cana-de-açúcar avaliada por meio de variáveis morfofisiológicas**. 2010. 65 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

PORTO, R. L.; ZAHED FILHO, K.; SILVA, R. M.; DOURADO, S. S. S. **Evapotranspiração**, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 31p., 2000. Disponível em:< <http://www.netsaber.com.br/apostilas/apostilas/574.pdf>> Acesso em: 30 outubro 2011.

POULTON, J. E. Cyanogenesis in plants. **Plant Physiology**, v. 94, p. 401-405, 1990.

RAYCHAUDHURI, A.; TIPTON, P. A.; Cloning and expression of the gene for soybean hydroxyisourate hydrolase. Localization and implications for function and mechanism. **Plant Physiol**, v. 130, p. 2061-2068, 2002.

RECCHIA, G. H. **Identificação de genes diferencialmente expressos em feijoeiro envolvido na resistência ao estresse hídrico**. 2011. 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo – USP, Piracicaba.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1189-1202, 2004.

REDKAR, R. J.; HERZOG, R. W.; SINGH, N. K. Transcriptional activation of the *Aspergillus nidulans* gpdA promoter by osmotic signals. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 64, p. 2229-2231, 1998.

REICHHARTA, D. W.; BAK, S.; PAQUETTE, S. **Cytochromes P450**. The *Arabidopsis* Book Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, 2002.

REIJANS, M., LASCARIS, R., GROENEGER, A. O., WITTENBERG, A., WESSELINK, E., VAN OEVEREN, J., DE WIT, E., BOORSMA, A., VOETDIJK, B., VAN DER SPEK, H., GRIVELL, L. A.; SIMONS G. Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and GeneChip expression data in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genomics**, v. 82, p. 606-618, 2003.

REN, J.; DAI, W.; XUAN, Z.; YAO, Y.; KORPELAINEN, H.; LI, C. The effect of drought and enhanced UV-B radiation on the growth and physiological traits of two contrasting poplar species. **Forest Ecology and Management**, v. 239, p. 112–119, 2007.

RIERA, M.; VALON, C.; FENZI, F.; GIRAUDAT, J.; LEUNG, J. The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signaling components. **Physiologia Plantarum**, v.123, p.111-119, 2005.

RODRIGUES, J. D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. 1995. Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências, Botucatu-SP.

RODRÍGUEZ, M.; CANALES, E. BORRÁS-HIDALGO, O. Molecular aspects of abiotic stress in plants. **Biotecnologia Aplicada**, La Habana, v. 22, p. 1-10, 2005.

ROSENFELD, U. **Determinação do período crítico de deficiência hídrica para a cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 1989. 88p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

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 em Ciências – Área: Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SAITO, S.; HIRAI, N.; MATSUMOTO, C.; OHIGASHI, H.; OHTA, D.; SAKATA, K.; MIZUTANI, M. Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a

key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 134, n. 4, p.1-11, 2004.

SAMARAS, Y., R. A.; BRESSAN, L. N.; CSONKA, M.; GARCIA-RIOS, M.; D'URZO, P.; RHODES, D. Proline accumulation during water deficit. In: Smirnoff N, ed. Environment and plant metabolism. **Flexibility and acclimation**. Oxford: Bios Scientific Publishers. 1995.

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

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

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. **Anatomia e botânica**. In: Dinardo-Miranda, L. L.; Vasconcelos, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed). Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p. 47-56.

SCHOCH, G.; GOEPFERT, S.; MORANT, M.; HEHN, A.; MEYER, D.; ULLMANN, P.; et al. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3O-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. **J Biol Chem**, v. 276, p. 36566-36574, 2001.

SCHULER, M. A. Plant cytochrome P450 monooxygenases **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.15, p.235–284, 1996.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 221-227, 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, n. 5, p. 410-417, 2003.

SILVA, P. B. **Aspectos Fisiológicos De Seis Genótipos De Cana-De-Açúcar Submetidos A Estresse Hídrico**. 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia na Área de Produção Vegetal e Proteção de Plantas) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Rio Largo.

SILVA, M. A.; SOARES, R. A. B.; LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P. Agronomic performance of sugarcane families in response to water stress. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 3, p. 655-661, 2008.

SINGELS, A.; DONALDSON, R. A.; SMIT, M. A. Improving biomass production and partitioning in sugarcane: theory and practice. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, p. 291-303, 2005.

SMIT, M. A.; SINGELS, S. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, Ontario, v. 98, n. 2-3, p. 91-97, 2006.

SONG, D. **Homologous strand exchange and DNA helicase Activities in plant mitochondria**. 2005. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Brigham Young University, Provo, UT.

SOUZA, A. P. **Mecanismos fotossintéticos e relação fonte-dreno em cana-de-açúcar cultivada em atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub>**. 2011. 208 f. Tese (Doutorado em Biociências na Área de Fisiologia em Bioquímica de Plantas) – Universidade de São Paulo, USP, São Paulo.

SREENIVASA, T. V.; AHLOOWALIA, B. S.; HEINZ, D. J. Cytogenetics. In Heinz, D. J. (Ed) **Sugarcane Improvement through breeding Elsevier**, Amsterdam, 1987. p.211-253.

STEIN, J.; LIANG, P. Differential display technology: a general guide. **Cellular Molecular Life Science**, Basel, v. 8, p.1235-1240, 2002.

SUGIHARTO, B. Biochemical and molecular studies on sucrose-phosphate synthase and drought inducible-protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Journal ILMU DASAR**, Jember, v. 5, n. 1, p. 62-67, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A, 2004. 719 p.

TAKEMOTO, D.; HAYASHI, M.; DOKE, N.; NISHIMURA, M.; KAWAKITA, K. Molecular cloning of a defense-response-related cytochrome p450 gene from tobacco. **Plant and Cell Physiology**, v. 40, n.12, p.1232-1242. 1999.

TUTEJA, N. Plant DNA helicases, the long unwinding road. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 2201–2214, 2003.

TUTEJA, T.; TUTEJA, R. Unraveling DNA helicases: motif, structure, mechanism and function, **Eur. J. Biochem**, v. 271, p. 1849–1863, 2004.

TZVELEV, N. N. The system of grasses(Poaceae) and their evolution. **The Botanical Review**. Lancaster, v. 55, n. 3, p. 141-204, 1989.

UNICA. União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. **Moagem de cana na região Centro-Sul até final de outubro atinge 459,56 milhões de toneladas**. 2011. Disponível em:

<<http://www.unica.com.br/clipping/show.asp?cppCode=49D93B9E-380B-46A1A5E4-4DD3B11BAB9A>> Acesso em: 17 novembro 2011.

VASHISHT, A. A.; TUTEJA, N. Stress responsive DEAD-box helicases: A new pathway to engineer plant stress tolerance. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p. 150–160, 2006.

VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, v. 270, p.484-487, 1995.

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

VUYLSTEKE, M.; PELEMAN, J. D.; VAN EIJK, M. J. T. () AFLP-based transcript profiling (cDNA AFLP) for genome-wide expression analysis. **Nat Protoc**, v. 2, p. 1399–1413, 2007.

WILLIAMSON, C. L.; SLOCUM, R. D. Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the 1-pyrroline-5-carboxylate reductase (proC) gene in Pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology**, v. 100, p.1464-1470, 1992.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. **Photosynthetica**, v. 38, n. 1, p. 171-186, 2000.

YUXIN, P.; MA, J.; ZHANG, G. Y.; HAN, G. Y.; WANG, X. F.; MA, Z. Y. cDNA-AFLP profiling for the fiber development stage of secondary cell wall synthesis and transcriptome mapping in cotton. **Chinese Science Bulletin**, v. 52, n. 17, p. 2358-2364, 2007.