

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

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL
POR cDNA-AFLP EM RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR
SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO

Juliana da Silva Vantini

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2013

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

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL
POR cDNA-AFLP EM RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR
SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO

Juliana da Silva Vantini

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

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

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2013

V282e Vantini, Juliana da Silva
Expressão gênica diferencial por cDNA-AFLP em raízes de cana-de-açúcar submetida ao déficit hídrico / Juliana da Silva Vantini. – – Jaboticabal, 2013
x, 105 f. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Maria Inês Tiraboschi Ferro
Coorientador: Miguel Ângelo Mutton
Banca examinadora: Flávia Maria de Souza Carvalho, Luciana Rossini Pinto, Poliana Fernanda Giachetto, Samira Domingues Carlin
Bibliografia

1. Estresse abiótico. 2. *Saccharum spp.* 3. RT-qPCR. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61:631.52

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

JULIANA DA SILVA VANTINI – nascida em 31 de março de 1981, no município de Jaboticabal – sp, filha de Arségio Vantini e Lúcia Maria da Silva Vantini. Bióloga, graduada em Bacharelado e Licenciatura pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, em dezembro de 2003. Em agosto de 2004 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticaval), obtendo o título de mestre em janeiro de 2007. Em março de 2009 iniciou o curso de doutorado vinculado ao mesmo Programa de Pós-Graduação.

“Se podes imaginar, podes conseguir”

Albert Einsten

*À Deus, pela vida maravilhosa que me concedeu
com muita saúde, amor, trabalho e felicidade!!!*

*Aos meus queridos pais Arségio e Lúcia,
muito obrigada pelos ensinamentos,
pelo amor, carinho e incentivo!! Amo vocês!!*

*Ao meu querido irmão Fábio e sua namorada Helô,
agradeço pelo apoio, carinho e amor!!!*

*Ao meu namorado Tadeu, muito obrigada pelo apoio,
carinho, amor e companheirismo!!*

*À minha orientadora Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro,
por ter sido uma luz em meu caminho científico!!*

DEDICO E AGRADEÇO

*Agradeço a Deus novamente, por ter me dado a
Mel, a Branca e a Belinha, as quais me
proporcionaram momentos de alegria e
descontração!!!*

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo de maravilhoso que Ele tem me dado!!!!!!!

Aos meus orientadores Profa. Dra. Maria Inês T. Ferro e Prof. Dr. Miguel A. Mutton, pelos ensinamentos, incentivo e confiança durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Jesus A. Ferro, pelos ensinamentos e auxílio no desenvolvimento do experimento e análises da prolina.

Ao Prof. Dr. Dilermando Perecin, pelas análises estatísticas do experimento de prolina.

Ao Prof. Dr. Rinaldo Cesar de Paula (Coordenador do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas), pela amizade e contribuição para a minha formação acadêmica.

Às pesquisadoras Dra. Luciana Rossini Pinto e Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza e à Msc. Bruna Sousa Gonçalves do Instituto Agrônomo de Cana-de-Açúcar (IAC/Ribeirão Preto, S.P., Brasil), por toda a intensa colaboração, auxílio e orientação.

À Bruna Sousa Gonçalves que foi um anjinho, sempre me auxiliou nos momentos mais difíceis da técnica de cDNA-AFLP.

À Pesquisadora Dra. Samira Domingues Carlin, por me auxiliar no aprendizado da técnica de extração de prolina.

À professora Eliana G. M. Lemos, Profa. Dra. Lucia M. C. Alves e Camila pela disponibilidade de uso do equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time.

À Bioinformata Msc. Renata I. D. Tezza, por todo auxílio nas análises de bioinformática.

Às queridas amigas Gisele C. Dedemo e Daniele F. J. Gimenez, pela amizade, carinho, confiança, ensinamentos e contribuição para o meu trabalho.

Aos amigos e companheiros de trabalho da casa-de-vegetação Gisele C. Dedemo, Daniele F. J. Gimenez, Arthur Rossini, Osmar e Tião, pelo intenso trabalho realizado e pelos momentos de descontração e alegria.

Ao amigo Msc. Daniel Carvalho Leite, por me auxiliar no aprendizado da técnica de cDNA-AFLP.

Aos amigos Rafael Marine, Fabrício e Lucas por toda a ajuda em programas de computadores.

Aos amigos Dani, Elaine, Larissa e André Splinter pelo auxílio na técnica de RT-qPCR.

Aos meus queridos amigos: Gigi Dedemo, Dani, Karina, Agda, Lúcia, Aline, Ana Carolina, Flávia Carvalho, Elaine, Renata, Larissa, Splinter, Bruna Robiati, Bruna Gonçalves, Julinho, Fabrício, Rafael Marine, Mariza, Ângela, Lucília, Juliana “Gosminha”, Mayara, Claudênia, Teresa, Mariane, Andressa, Flavinha, Lucas, Gabi, Juan, Sônia, Nayara, Flávia, Andréia, Cedral, Raquel, Rafael Jack, Gustavo e Miguel; muito obrigada pela amizade, companheirismo e contribuição!!!!

Aos componentes da banca de qualificação: Dra. Luciana Rossini Pinto, Dra. Samira Domingues Carlin, Dra. Agda Paula Facincani e Profa. Dra. Janete Desidério Sena, agradeço pela participação e contribuição.

Aos componentes da comissão examinadora: Dra. Poliana Fernanda Giachetto, Dra. Luciana Rossini Pinto, Dra. Samira Domingues Carlin e Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho, agradeço pela participação e importantes contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia, agradeço pela amizade e contribuição.

Ao pessoal do atendimento da Pós-Graduação, agradeço pela atenção e simpatia.

Ao auxílio financeiro da CAPES, pela bolsa de doutorado.

Meus sinceros agradecimentos!!!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
2.1. Objetivos Gerais	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Aspectos gerais da cana-de-açúcar	5
3.2. A cana-de-açúcar e sua importância econômica.....	8
3.3. Déficit hídrico em plantas	9
3.4. Resposta da planta ao estresse por déficit hídrico	11
3.5. Técnica de cDNA-AFLP	15
3.6. RT – qPCR (PCR Quantitativo em Tempo Real).....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Material Vegetal e Condução Experimental	19
4.2. Coleta das raízes de cana-de-açúcar.....	22
4.3. Determinação do Teor de Prolina Livre	23
4.4. Extração do RNA total.....	25
4.5. Quantificação do RNA total.....	27
4.6. Integridade do RNA total	27
4.7. Síntese dos cDNAs Dupla-Fita.....	28
4.8. Purificação dos cDNAs Dupla-Fita pelo Método Fenol-Clorofórmio.....	29
4.9. Técnica de cDNA-AFLP	30
4.9.1. Reação de Restrição	30
4.9.2. Reação de Ligação dos Adaptadores.....	31
4.9.3. Reação de Amplificação Pré-Seletiva.....	31
4.9.4. Reação de Amplificação Seletiva (Modificada para Eletroforese com Gel de Poliacrilamida 6%).....	32
4.10. Preparo da eletroforese em Gel de Poliacrilamida 6% (7 M ureia) corado com Nitrato de Prata.....	33
4.11. Análise Visual e Obtenção dos Fragmentos Diferencialmente Expressos da Cultivar Tolerante Estressada (FDE-CvTE).....	36

4.12. Purificação dos FDE-CvTE recuperados do gel de poliacrilamida 6%.....	37
4.13. Clonagem dos FDE-CvTE.....	37
4.14. Preparo das células de <i>E. coli</i> (DH10B) quimicamente competentes.....	38
4.15. Transformação Química dos FDE-CvTE, Seleção e Estoque dos Clones Positivos	39
4.16. Sequenciamento dos clones positivos	40
4.16.1. Micropreparação de DNA plasmidial.....	40
4.16.2. Reação de seqüenciamento.....	42
4.16.3. Lavagem das reações para o sequenciamento	42
4.16.4. Sequenciamento dos FDE-CvTE.....	43
4.16.5. Análise dos FDE-CvTE	43
4.16. Validação dos resultados por PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR).....	46
4.16.1. Síntese de cDNA, desenho dos oligonucleotídeos e PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR).....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1. Escolha do material vegetal.....	51
5.2. Déficit hídrico em cana-de-açúcar	51
5.4. Quantificação e integridade do RNA total de raízes de cana-de-açúcar.....	57
5.5. Quantificação do cDNA de raízes de cana-de-açúcar.....	61
5.6. Análise da técnica de cDNA-AFLP	62
5.7 Fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante estressada (FDE-CvTE) categorizados como envolvidos em resposta ao estresse	74
5.8. Fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante estressada (FDE-CvTE) categorizados como proteínas hipotéticas conservadas	80
5.9. Fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante estressada (FDE-CvTE) categorizados como proteínas não classificadas.....	81
5.10 Validação dos resultados da técnica de cDNA-AFLP pela técnica de PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)	82
6. CONCLUSÕES	92
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL POR cDNA-AFLP EM RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO - A cultura de cana-de-açúcar se destaca mundialmente pela produção de açúcar e etanol. O Brasil comercializa mais da metade do açúcar no mundo. Esta cultura passa por diversos estresses ambientais, sendo a seca o fator ambiental que causa maiores impactos econômicos. O estudo de genes diferencialmente expressos em resposta ao déficit hídrico em cana-de-açúcar foi o principal objetivo deste trabalho. Inicialmente, foram monitorados os níveis dos teores de prolina para verificar o estudo de tolerância ao déficit hídrico entre as cultivares RB867515 (tolerante) e SP86-155 (sensível). Por meio da técnica de cDNA-AFLP foram realizadas análises comparativas entre as duas cultivares analisadas quando submetidas ao déficit hídrico por 1, 3, 5 e 10 dias. Nove combinações de oligonucleotídeos seletivos *EcoRI/MseI* permitiram visualizar em gel de poliacrilamida 173 fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante estressada (FDE-CvTE) quando comparada à cultivar sensível. Destes, 72 FDE-CvTE foram clonados, seqüenciados e categorizados (UniProtKB). As análises de similaridade revelaram homologia com proteínas envolvidas em atividades de chaperonas, inibidoras de protease, ao ácido abscísico, glutathione peroxidase 4 (ROS), fatores de transcrição (Myb; bHLH), domínios (NBS-LRR; *zinc-finger*) e proteínas com nenhuma similaridade encontrada (não classificados). As expressões gênicas dos FDE-CvTE, correspondentes a Proteína dissulfeto isomerase, Trealose, HSP70 e um fragmento não classificado, foram confirmadas pela técnica de RT-qPCR. Nossos resultados comprovam que múltiplos genes estão atuando em funções importantes nas respostas de tolerância ao déficit hídrico.

Palavras-chave: Estresse abiótico, *Saccharum spp*, RT-qPCR, chaperonas, prolina, seca

DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION USING cDNA-AFLP IN SUGAR CANE ROOTS SUBMITTED TO WATER DEFICIT

SUMMARY - Worldwide, sugar cane is the primary source for the production of sugar and ethanol. Brazil produces more than half of the sugar in the world. There are several environmental stresses that sugar cane crops are subjected to. Drought is the environmental factor that causes major economical impact. The analysis of differentially expressed sugar cane genes towards water stress deficiency were the aim of this study. Proline levels were monitored to check for drought tolerance among the two cultivars, one of them tolerant (RB867515) and one sensitive (SP86-155). Using cDNA-AFLP technique, a comparative analysis was performed on two sugar cane cultivars subjected to water deficit for 1, 3, 5 and 10 days period. Nine combinations of EcoRI/MseI selective oligonucleotides allowed us to visualize using polyacrylamide gels 173 differentially expressed fragments in the stressed tolerant cultivar (DEF-ETCv) when compared to the sensitive one. Of those, 72 DEF-ETCv were cloned, sequenced and categorized (UniProtKB). The analysis of similar proteins showed homology those involved in chaperone activity, protease inhibitors, abscisic acid, glutathione peroxidase 4 (ROS), transcription factors (Myb; bHLH), domains NBS-LRR and zinc-finger and proteins with no similarity (no hits). RT-qPCR technique confirmed the expression of the following proteins for the DEF-ETCv: disulfide isomerase protein, Trehalose, HSP70 and one no hit. Our results showed that multiple genes were acting in important roles in response to drought tolerance.

Keywords: Abiotic stress, *Saccharum spp*, RT-qPCR, chaperone, proline, drought

1. INTRODUÇÃO

A cultura de cana-de-açúcar é extremamente importante em países tropicais (AZEVEDO et al., 2011). Sua expansão no Brasil tem sido impulsionada pela crescente demanda por biocombustíveis em todo o mundo (ENDRES et al., 2010). Devido a esta crescente produção a cana-de-açúcar vem sendo afetada direta ou indiretamente por muitos fatores ambientais e o déficit hídrico vem a ser um dos fatores abióticos mais agravantes. A seca pode reduzir significativamente os rendimentos das lavouras, sendo a principal causa da redução da produtividade (DEDEMO et al., 2013; SALES et al., 2012; FLEXAS et al., 2006; NEPOMUCENO et al., 2001).

De acordo com Sanches (2012), o déficit hídrico decorrente da seca se estabelece quando a absorção de água pelas raízes não consegue atender as demandas da planta, entre as quais estão a fotossíntese e a transpiração, essenciais ao crescimento vegetal. Nestes períodos de déficit hídrico, algumas mudanças são ocasionadas na planta, isto vai depender do tempo e da severidade do estresse, do genótipo, do estágio de desenvolvimento e da natureza do estresse (KRAMER e BOYER, 1995).

Melo et al. (2007) trabalhando com duas gramíneas (setária e paspalo) sob suspensão total da rega até o murchamento e enrolamento foliar contínuo destas espécies observaram que ambas apresentaram ampla adaptação fisiológica e anatômica que confere tolerância às condições de deficiência hídrica. Segundo Vinecky et al. (2011) a seca induz diversas respostas fisiológicas e moleculares nas plantas, incluindo alterações da expressão gênica, visando atingir ajuste osmótico (aumento nos teores de prolina), a indução de reparadores de sistemas moleculares e a expressão de diversas proteínas protetoras.

Quando estas mudanças ocorrem o sistema radicular é a primeira região da planta a detectar e sinalizar às demais células, tecidos e órgãos os efeitos do estresse. A emissão de sinais químicos pelas raízes também ocasiona modificações no comportamento estomático durante o déficit hídrico (TAIZ; ZEIGER, 2004; SAUTER; DAVIES; HARTUNG, 2001).

Sendo assim, o desenvolvimento de novos genótipos de plantas, mais tolerantes a períodos prolongados de déficit hídrico, será essencial para a agricultura e a economia mundial. Genes identificados em mecanismos de tolerância poderão auxiliar na compreensão da base evolutiva dos mecanismos de adaptação ao estresse e têm mostrado potencial para serem usados em estudos de transformação de plantas. Mas, ainda devem ser testados quanto à produtividade nos campos de produção agrícola (LENKA et al., 2011; NEPOMUCENO et al., 2001).

Para investigar genes de plantas diferencialmente expressos em resposta a estresses bióticos ou abióticos uma ampla variedade de técnicas tem sido empregadas, como exemplo RNA Seq, SAGE, RT-qPCR, macro e microarranjos, cDNA-AFLP, entre outras. Dentre estas, o cDNA-AFLP é uma técnica rápida e de baixo custo, de boa reprodutibilidade e sensibilidade para o estudo da expressão gênica e tem sido utilizado com sucesso para a identificação de genes diferencialmente expressos em plantas, inclusive em cana-de-açúcar (LESTARI et al., 2006; CARMONA et al., 2004; BACHEM; OOMEN; VISSER, 1998). Dedemo (2011) afirmou que a técnica de cDNA-AFLP foi eficaz para a determinação da expressão gênica diferencial de genótipos contrastantes de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico.

De acordo com Vinecky et al. (2011) existem diversas formas de se avaliar a expressão gênica em plantas submetidas ao estresse hídrico. Uma técnica amplamente utilizada nos últimos anos, para a análise quantitativa da expressão gênica é a de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Além disso, esta técnica também vem sendo muito utilizada na validação dos resultados obtidos em muitos experimentos. A técnica de RT-qPCR é a mais precisa para quantificar níveis de expressão de um determinado gene e também oferece dados rápidos e reprodutíveis (STOLF, 2007).

No presente estudo foi realizada, por meio do cDNA-AFLP, a análise comparativa do perfil de expressão gênica no tecido radicular de uma cultivar de cana-de-açúcar tolerante (RB867515) com outra sensível (SP86-155) ao déficit hídrico sob a supressão de rega nas quatro épocas de amostragem (1, 3, 5 e 10 dias). Avaliou-se também a expressão dos níveis de prolina (osmoprotetor) para

verificar o estudo de tolerância ao déficit hídrico. Para validar os resultados de expressão gênica obtidos pelo cDNA-AFLP, foi utilizada a técnica de RT-qPCR.

Os resultados apresentados neste trabalho podem contribuir para o entendimento dos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico em culturas de cana-de-açúcar e podem também auxiliar no desenvolvimento de novos genótipos de plantas mais adaptadas ao déficit hídrico.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo avaliar, por meio da técnica de cDNA-AFLP, o perfil de expressão gênica de uma cultivar de cana-de-açúcar tolerante à seca (RB867515) comparada com outra sensível (SP86-155), quando submetidas ao déficit hídrico em quatro épocas de amostragem. Validar os resultados da técnica de cDNA-AFLP pela técnica de RT-qPCR.

2.2. Objetivos Específicos

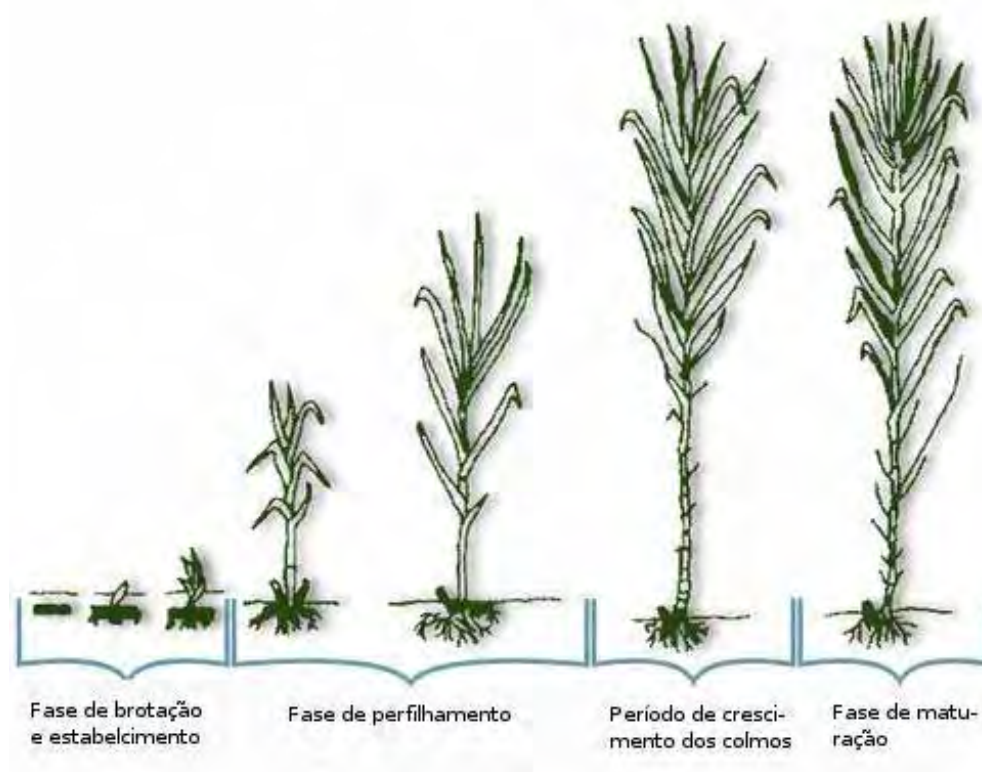
- Monitorar os níveis de prolina durante o mesmo tratamento com o objetivo de investigar o comportamento da mesma ao longo da deficiência hídrica.
- Identificar fragmentos diferencialmente expressos na cultivar de cana-de-açúcar tolerante à seca (RB867515) quando comparado à cultivar sensível (SP86-155) sob deficiência hídrica nas quatro épocas de amostragem (1, 3, 5 e 10 dias) através da técnica de cDNA-AFLP.
- Testar 3 genes de expressão constitutiva, proteína 14-3-3, actina e β -tubulina, a fim de selecionarmos o mais adequado para a normalização dos dados e padronizarmos as reações de validação do experimento com a técnica de RT-qPCR.
- Validar os resultados da técnica de cDNA-AFLP pela técnica de RT-qPCR com alguns fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante escolhidos aleatoriamente.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos gerais da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, originária do Sudeste Asiático, é uma monocotiledônea alógama e semi-perene, pertence à ordem Poales, família Poaceae, tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum* (FERRO, 2008). Tzvelev (1989) descreve que a família Poaceae é conhecida como a família das gramíneas, dentre elas os cereais, milho, trigo, arroz e sorgo, além de outras culturas forrageiras. Segundo Irvine (1999), o gênero *Saccharum* é composto por seis espécies, duas são silvestres (*S. spontaneum* e *S. robustum*) as demais são apenas para o cultivo (*S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense* e *S. edule*). As espécies *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense* são interférteis. A partir do cruzamento entre estas espécies houve a produção dos híbridos interespecíficos que constituem as modernas variedades comerciais.

A cultura de cana-de-açúcar possui 4 tipos de estágios fenológicos. Dentre eles, a brotação e emergência: esta fase depende da qualidade da muda, ambiente, época e manejo do plantio. Neste estágio, ocorre o enraizamento inicial e o aparecimento das primeiras folhas; o perfilhamento: emissão de colmos por uma mesma planta, a formação do sistema radicular da touceira é resultado do desenvolvimento das raízes de cada perfilho; o crescimento dos colmos: é estimulado por luz, umidade e calor, o crescimento radicular é vigoroso; e a maturação dos colmos: armazenamento de açúcar (EMBRAPA, 2013) (Figura 1).

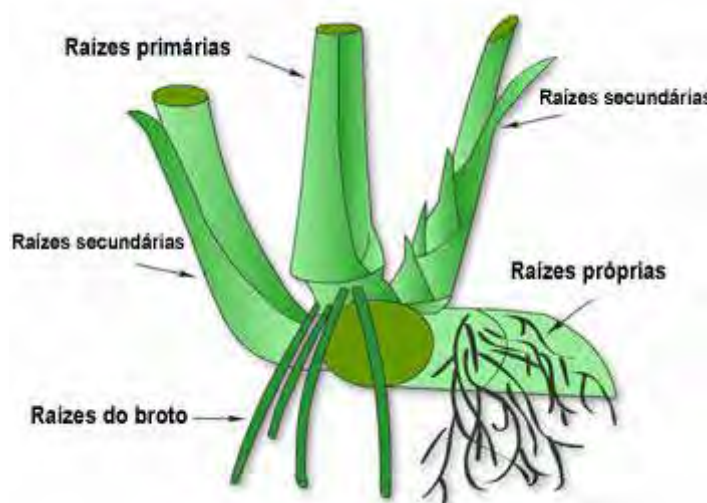


Fonte: Gascho e Shih (1983)

Figura 1. Estágios fenológicos da cana-de-açúcar.

As raízes desta planta são classificadas como raízes do tolete (ou de fixação) e raízes do perfilho. As raízes do tolete são originadas a partir de primórdios radiculares do tolete de plantio, são delgadas e ramificadas. Já as raízes do perfilho são originadas a partir dos primórdios radiculares do perfilho, sendo mais espessas, com coloração clara e menos ramificada. No período entre o plantio e a formação de raízes do perfilho, a absorção de água e nutrientes é garantida pelas raízes do tolete. A funcionalidade das raízes do tolete diminui, na medida em que as do perfilho são formadas. As raízes do perfilho também apresentam funcionalidade por tempo limitado. Entretanto, como cada novo perfilho forma suas raízes, o sistema radicular permanece em desenvolvimento (AGRICULTURA EM FOCO, 2011) (Figura 2). Segundo Rodrigues (1995), o perfilhamento ocorre de maneira abundante na fase inicial do desenvolvimento. Quando se estabelece como cultura, o

autosombreamento induz inibição do perfilhamento e aceleração do crescimento do colmo principal. O crescimento em altura continua até a ocorrência de alguma limitação no suprimento de água, ocorrência de baixas temperaturas ou ainda devido ao florescimento, estes processos são indesejáveis em culturas comerciais.



Fonte: Agricultura em foco (2011)

Figura 2. Ilustração de raízes do tolete e do perfilho de cana-de-açúcar.

Os seus colmos podem atingir até três metros de altura, compostos de nós e entrenós visíveis. As folhas são longas, formato lanceolado, com bordas serradas por pêlos, possui uma venação central bem evidenciada na face abaxial. Na fase de maturação, a planta de cana-de-açúcar exige temperaturas baixas, abaixo de 20°C e/ou déficit hídrico para que haja repouso fisiológico e, conseqüente, maior acúmulo de sacarose nos colmos (ANDRADE, 2006). Quando em fase reprodutiva, apresenta inflorescência terminal do tipo paniculada, plumosa na base, com flores pequenas e hermafroditas, que produzem cariopses com formato elíptico alongado (CASAGRANDE, 1991). O seu metabolismo fotossintético é do tipo C₄, o qual possui uma alta eficiência em converter energia radiante em energia química. Entretanto, as

características das cultivares influenciam a eficiência fotossintética da planta, além das variações climáticas prevalecidas durante o desenvolvimento da mesma (RODRIGUES, 1995).

3.2. A cana-de-açúcar e sua importância econômica

A cultura de cana-de-açúcar tem grande importância econômica e social para o Brasil, além de se apresentar como uma alternativa ao petróleo, tanto pela produção de energia renovável (etanol combustível e energia elétrica) quanto pela capacidade de fornecer carbono para a síntese de compostos que hoje são produzidos a partir do petróleo. O uso de toda a sua potencialidade passa pelo desenvolvimento de tecnologias que permitam utilizar não apenas o carbono prontamente disponível no caldo, na forma de açúcares solúveis, mas também o açúcar insolúvel presente no bagaço e folhas, principalmente aqueles na forma de celulose e hemicelulose (FERRO, 2008).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com mais de sete milhões de hectares plantados, produzindo mais de 480 milhões de toneladas de cana, o que coloca o País na liderança mundial em tecnologia de produção de etanol. Além de matéria-prima para a produção de açúcar e etanol, seus subprodutos e resíduos são utilizados para co-geração de energia elétrica, fabricação de ração animal e fertilizante para as lavouras (EMBRAPA, 2013). Responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo, o Brasil deve alcançar taxa média de aumento da produção de 3,25%, até 2018/19, e colher 47,34 milhões de toneladas do produto, o que corresponde a um acréscimo de 14,6 milhões de toneladas em relação ao período 2007/2008. Para as exportações, o volume previsto para 2019 é de 32,6 milhões de toneladas. O etanol, produzido no Brasil, também conta com projeções positivas para os próximos anos. A produção projetada para 2019 é de 58,8 bilhões de litros, mais que o dobro da registrada em 2008 (AGRICULTURA EM FOCO, 2012).

A produção de cana-de-açúcar se concentra nas regiões Centro-Sul e Nordeste do Brasil. O mapa abaixo mostra em vermelho as áreas onde se

concentram as plantações e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade, segundo dados oficiais do IBGE, UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas – SP) e do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) (ÚNICA, 2012) (Figura 3).

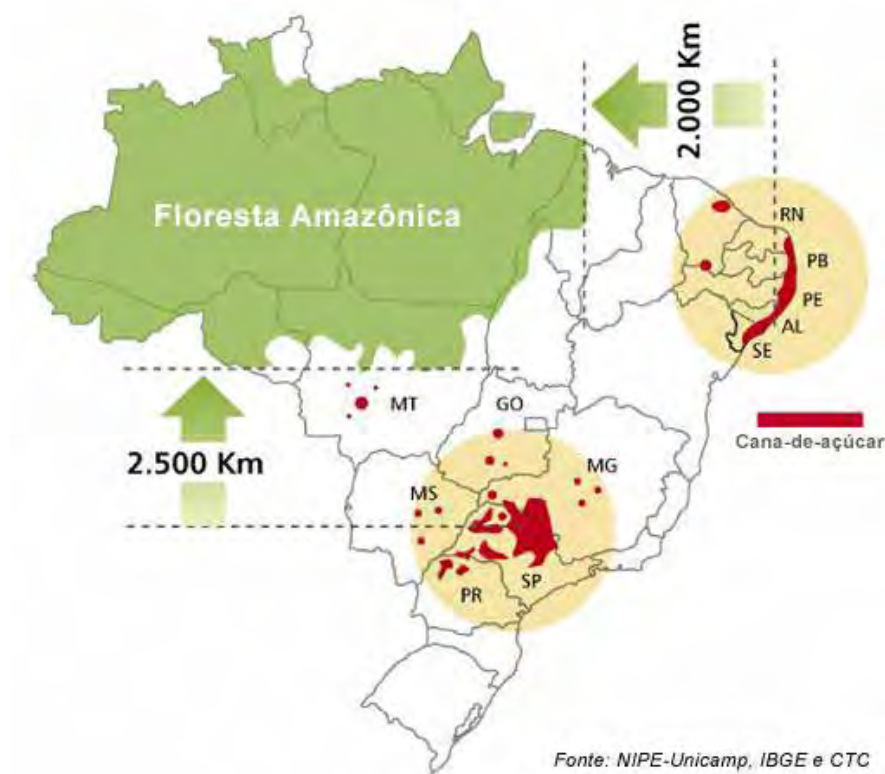


Figura 3. Mapa de produção de cana-de-açúcar no Brasil (ÚNICA, 2012).

3.3. Déficit hídrico em plantas

Muitos fatores ambientais afetam direta ou indiretamente as plantas, o déficit hídrico vem a ser um dos fatores abióticos de grande impacto no crescimento e desenvolvimento das plantas (DEDEMO et al., 2013). Segundo Nepomuceno et al. (2001), a seca pode reduzir significativamente os rendimentos das lavouras e restringir as latitudes e os solos onde espécies comercialmente importantes podem ser cultivadas. As implicações são enormes, uma vez que produtores e toda a

sociedade são afetados: desemprego, aumento no preço de alimentos e instabilidade no mercado financeiro são somente algumas das consequências. Em Alagoas, a estiagem entre março a abril de 2012 afetou a produção de cana-de-açúcar com uma perda de mais de 20% na produção (G1 GLOBO RURAL, 2012).

Nestes períodos de déficit hídrico, muitas mudanças são ocasionadas na planta, isto vai depender do tempo e da severidade do estresse, do genótipo, do estágio de desenvolvimento e da natureza do estresse (KRAMER; BOYER, 1995). Quando estas mudanças ocorrem, o sistema radicular é a primeira região da planta a detectar e sinalizar às demais células, tecidos e órgãos os efeitos do estresse. A emissão de sinais químicos pelas raízes é responsável por modificações no comportamento estomático durante o déficit hídrico (GRAÇA, 2009; TAIZ; ZEIGER, 2004). A desidratação de partes das raízes pode causar parcial fechamento dos estômatos, evidenciando que o fechamento estomático está mais relacionado ao conteúdo hídrico do solo do que ao próprio conteúdo hídrico da planta (TAIZ; ZEIGER, 2004). O fechamento estomático bloqueia a entrada de CO₂ nas folhas, reduzindo assim o acúmulo de fotoassimilados e posteriormente, a produtividade da planta (OBER; LUTERBACHER, 2002). Com isto, as características fenotípicas da planta se modificam, conforme o grau do estresse hídrico.

Como a cana-de-açúcar acumula sacarose em altas concentrações, esta cultura tem sido o foco de diversas pesquisas bioquímicas e fisiológicas (RIBEIRO, 2012). Em estudos com deficiência hídrica, Gimenez (2011) trabalhou com três cultivares distintas de cana-de-açúcar, SP83-5073 (tolerante), RB867515 (tolerante) e SP86-155 (sensível) sob 4 épocas de amostragem (1, 3, 5 e 10 dias de supressão de rega). Ao longo de todas as épocas, a cultivar SP83-5073 quando comparada com sua planta controle, visivelmente não sofreu com a falta d'água. A RB867515 se diferenciou apenas no 10º dia de supressão de rega. Já a SP86-155 sentiu muito a falta d'água, principalmente na última coleta, devido ao aumento de folhas secas, quando comparada à sua planta controle. Estes resultados foram similares ao de Dedemo (2011), que também evidenciou que a cultivar SP86-155 possui maior sensibilidade ao estresse hídrico, apresentando amarelecimento, murchamento (redução da turgescência) e enrolamento das folhas superior ao observado nas cultivares tolerantes.

3.4. Resposta da planta ao estresse por déficit hídrico

Os diversos estresses abióticos (salinidade, diferenças na temperatura, seca, etc) favorecem as plantas um estresse secundário, osmótico e ou oxidativo, os quais causam rupturas das homeostases osmótica e iônica, gerando danos nas proteínas e membranas funcionais e estruturais. Estes sinais de degradação fazem com que plantas tolerantes aumentem os níveis de vários hormônios vegetais (ácido abscísico, ácido jasmônico e etileno), acúmulo de osmoprotetores, fatores de transcrição, enzimas e proteínas responsáveis pela ativação de muitos genes do mecanismo de resposta ao estresse, favorecendo assim o restabelecimento da homeostase celular, proteção funcional e estrutural de proteínas e membranas (Figura 4) (FERRO, 2008).

As plantas sob condições de estresse hídrico alteram seus processos fisiológicos, como mudanças na taxa de fotossíntese, abertura estomática, produção de ácido abscísico, abscisão foliar e ajuste osmótico (TAIZ; ZEIGER, 2004). Elas utilizam os mecanismos de tolerância como o ajuste osmótico, para manter o potencial de pressão em níveis adequados. A redução do potencial osmótico, devido ao déficit hídrico, pode favorecer uma concentração passiva de solutos, consequência da desidratação da célula, ou da acumulação ativa de solutos, sendo apenas a última considerada como ajuste osmótico (PATAKAS et al., 2002).

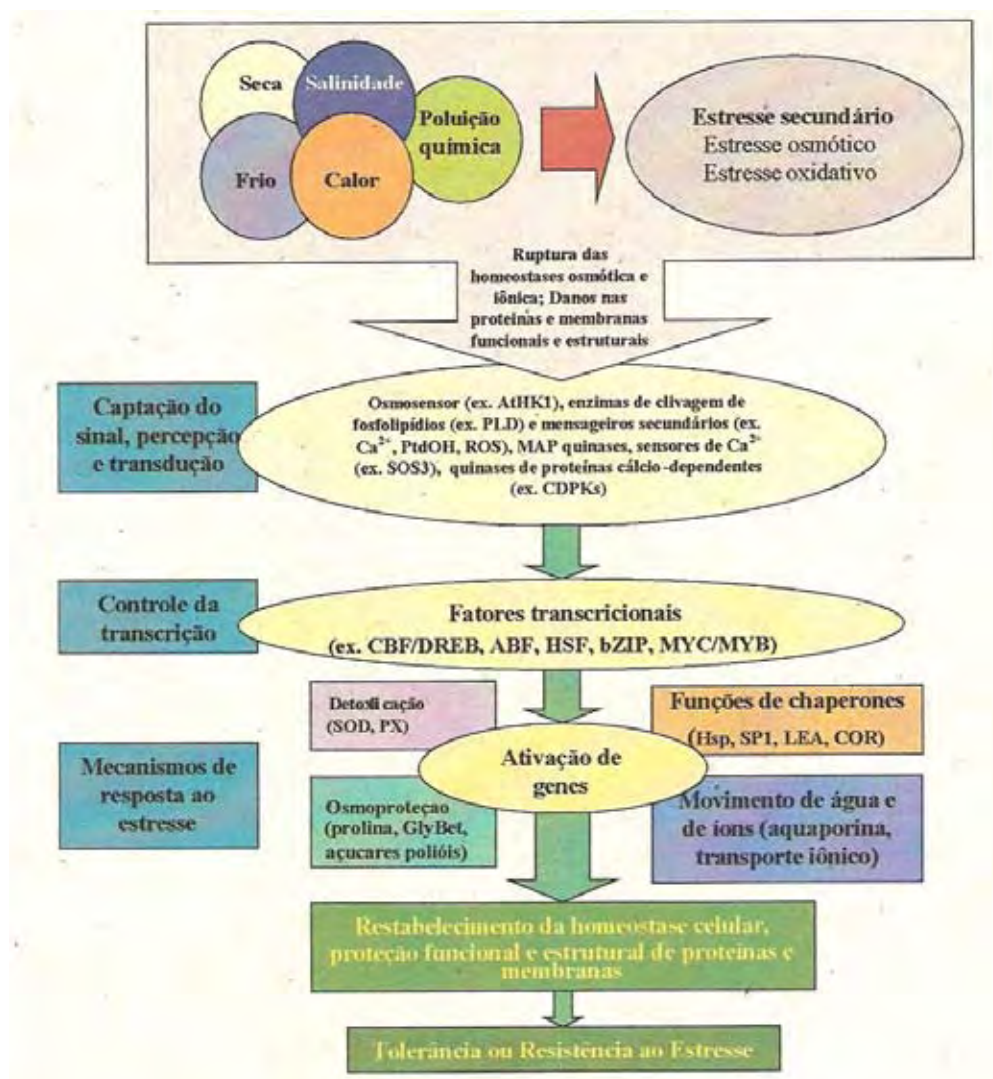


Figura 4. Representação esquemática de mecanismos de defesa desencadeados nas plantas, em resposta a fatores abióticos (WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003), citado em Ferro (2008).

Muitas substâncias atuam como osmoprotetoras, as que mais se destacam são: a glicina betaína, a trealose e a prolina. A glicina betaína protege as membranas dos tilacóides, o que mantém a eficiência fotoquímica na fotossíntese (ASHRAF; FOOLAD, 2007). A trealose protege membranas e proteínas, por conferir resistência à dessecação em células com deficiência hídrica (EL-BASHITI et al., 2005). Além de ser um carboidrato presente em plantas superiores, seu acúmulo

costuma ocorrer em espécies resistentes à seca (QUEIROZ et al., 2011). E a prolina atua, principalmente, na estabilização de proteínas e na proteção das membranas contra os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (SHARMA; DUBEY, 2005), citado em Carlin e Santos (2009). Segundo Kavi Kishor et al. (2005), a ligação do grupo amino a dois átomos de carbono confere à prolina livre uma molécula com característica neutra. De acordo com Reddy, Chaitanya e Vivekanadan (2004), a prolina possui um anel pirrolina, o qual possui uma baixa capacidade de ceder elétrons. No entanto, ela forma um complexo de transferência de carga e seqüestra O_2 livre, diminuindo danos por fotoinibição nas membranas do tilacóide, sequestrando e reduzindo a produção de íons superóxido. Sendo assim, a determinação dos teores de prolina em plantas submetidas ao estresse hídrico tem sido amplamente estudada. Gimenez (2011) afirmou que o teor de prolina livre nos palmitos de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico foi estatisticamente significativo a partir do terceiro dia de supressão de rega, onde verificou a maior média na cultivar RB867515, com 10 dias de supressão da rega.

Já o acúmulo de ácido abscísico (ABA) é fundamental para a proteção da planta, agindo diretamente no fechamento dos estômatos e indiretamente na abscisão foliar; está relacionado com o processo de senescência (escape para reduzir a perda de água pelas folhas) e também tem a função de regular a expressão de genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico (NARUSAKA et al., 2003; YOSHIDA et al., 2002). Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (1999) sugerem que genes induzidos por deficiência hídrica são ativados por duas rotas de percepção e transmissão do sinal de estresse: uma ABA-dependente e outra ABA-independente. Ferro (2008) não encontrou nenhuma evidência da participação de mecanismos ABA dependentes em resposta ao estresse hídrico em palmitos de cana-de-açúcar nas condições do experimento. Isto pode ser uma característica do tecido analisado, como também pode ser que ABA tenha sido formado e hidrolisado por um membro da família de citocromos P450 que tenha atividade ABA 8'-hidroxilase, como já identificado em outros tecidos sob condições de estresse hídrico.

Entretanto, a existência do acúmulo das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) está freqüentemente associado aos danos oxidativos ocasionados pelo

estresse hídrico em plantas. Tais danos oxidativos ocorrem quando há modificações oxidativas numa intensidade muito grande, de forma sustentada ao longo do tempo e que, portanto, supera a capacidade anti-oxidante celular, levando a alterações funcionais e estruturais descontroladas e por vezes letais às células. Esta condição caracteriza uma intoxicação por radicais livres que é comumente conhecida por estresse oxidativo. Por outro lado, os mecanismos de sinalização por ROS envolvem fenômenos oxidativos brandos, com aumentos transitórios e controlados de tais espécies. Uma vez cessado o estímulo, a maquinaria anti-oxidante celular restabelece o estado redox original, sem a ocorrência e/ou acúmulo de danos oxidativos celulares (CARDOSO et al., 2006). Enzimas como Tiorredoxinas (Trx), Superóxido dismutase, Glutathione redutase, Catalase, Glutathione peroxidase atuam como principais anti-oxidantes em danos oxidativos celulares. A Glutathione peroxidase é uma enzima que contém selênio, envolvida na redução de vários peróxidos, especialmente peróxidos de lipídeos de membrana formados durante insultos oxidativos severos (CARDOSO et al., 2006).

Um grupo de proteínas bem conhecidas, as proteínas de choque térmico (HSP) também são induzidas em plantas, quando submetidas ao déficit hídrico. (NEPOMUCENO et al., 2001). Provavelmente, a maioria das HSPs funcionam como chaperonas, estas ajudam no correto enovelamento ou na prevenção da desnaturação das proteínas. Uma maior síntese de HSP ajudaria a proteger proteínas durante o estresse osmótico que ocorre após a desidratação da célula (ZHU et al., 1997).

Enfim, mais estudos para o desenvolvimento de novos genótipos de plantas, mais tolerantes a períodos prolongados de déficit hídrico, serão essenciais para a agricultura e a economia mundial. Genes identificados em mecanismos de tolerância têm mostrado potencial para ser usados em estudos de transformação de plantas. Entretanto, ainda devem ser testados quanto à produtividade nos campos de produção agrícola. Alcançar esse tipo de resultado e obter plantas cada vez mais eficientes na tolerância aos estresses do ambiente somente está sendo possível devido à compreensão dos mecanismos moleculares de tolerância atuais e dos mecanismos que serão desvendados nas próximas décadas (NEPOMUCENO et al., 2001).

3.5. Técnica de cDNA-AFLP

Existe uma grande variedade de técnicas empregadas nas investigações de genes diferencialmente expressos de plantas em resposta a estresses bióticos ou abióticos. Ambrosone et al. (2012) afirmam que técnicas como microarranjos, análise serial da expressão gênica (SAGE), construção de bibliotecas subtrativas (SSH) e a mais recente tecnologia RNAseq, têm sido utilizadas para descrever as respostas genéticas das plantas aos estímulos ambientais.

No entanto, a técnica de cDNA-AFLP também é muito utilizada para o estudo dos processos biológicos, por ser simples, eficiente e de baixo custo para o estudo dos processos biológicos (BAISAKH; SUBUDHI; PARAMI, 2006). Vem a ser a união de cDNA com AFLP, criada por Vos et al. (1995), com uma amplificação seletiva por PCR de fragmento de restrição de cDNA com os adaptadores, criada por Bachem et al. (1996). Continua sendo um método muito utilizado e eficaz para estudar as comparações na expressão gênica (REIJANS et al., 2003).

A técnica de cDNA-AFLP permite a visualização simultânea de centenas de fragmentos de restrição oriundos da digestão dos cDNAs sintetizados a partir dos mRNAs expressos pelo organismo em estudo. Algumas das vantagens da técnica de AFLP são: apenas pequenas quantidades de cDNAs são necessárias; pode ser realizada a partir de uma variedade de amostras de DNA genômico ou de cDNA e nenhum conhecimento prévio da sequências é requerido (DEDEMO, 2011).

Esta técnica consiste em quatro passos. O primeiro passo vem a ser a síntese do cDNA a partir do RNA total, através do uso de oligonucleotídeos poli-dT. No segundo passo, é realizado a digestão dos fragmentos de cDNA com duas enzimas de restrição, uma com corte raro *EcoRI* (6-8 bases de reconhecimento) e outra com corte frequente *MseI* (4 bases de reconhecimento). Neste passo, são gerados três tipos de fragmentos (*EcoRI-EcoRI*, *MseI-MseI* e *EcoRI-MseI*). Assim ocorrerá a ligação dos adaptadores que são complementares às extremidades cortadas (BACHEM; OOMEN; VISSER, 1998).

O terceiro passo consiste em uma amplificação pré-seletiva onde são utilizados oligonucleotídeos com um ou nenhum nucleotídeo seletivo. Os produtos

de PCR dessa pré-amplificação são diluídos e usados como moldes para a próxima amplificação (seletiva), mas com um a três nucleotídeos seletivos (DEDEMO, 2011).

O quarto e último passo é uma amplificação seletiva onde são utilizados dois tipos de oligonucleotídeos. Um deles com uma região complementar ao adaptador (*EcoRI*) mais três nucleotídeos seletivos adicionais e o outro com uma região complementar ao adaptador (*MseI*) mais três nucleotídeos seletivos adicionais. Os fragmentos com as extremidades cortadas por enzimas diferentes são amplificados exponencialmente (BLEARS et al., 1998).

Terminados os quatro passos, a análise dos fragmentos de interesse pode ser realizada tanto por eletroforese em sequenciador automático, quanto em sequenciador vertical em gel de poliacrilamida, o qual é corado com nitrato de prata, as bandas de DNA podem ser visualizadas e recuperadas do gel de poliacrilamida previamente reidratado, seguido de eluição dos fragmentos em tampão, com posterior reamplificação, clonagem e sequenciamento (DEDEMO, 2011; GIMENEZ, 2011).

3.6. RT – qPCR (PCR Quantitativo em Tempo Real)

A técnica de RT-qPCR vem sendo muito utilizada com a finalidade de quantificar níveis de expressão de um determinado gene, devido à sua alta sensibilidade, principalmente para a detecção de RNAs mensageiros pouco abundantes e muitas vezes obtidos a partir de amostras de tecidos limitadas, mas essa técnica é complexa e traz consigo alguns problemas associados com à sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade das reações que, enquanto método quantitativo, possui limitações. Nesse contexto, segundo Bustin (2000), a recente introdução de fluorescência baseada na cinética de RT-qPCR, simplifica significativamente o processo de produção e de quantificação de mRNAs e promete ultrapassar estas limitações (Figura 5).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real possibilita o acompanhamento de todo o progresso da PCR enquanto ela ocorre. Assim os dados são coletados ao longo da PCR, em vez de serem observados apenas no final da

reação, como ocorre no PCR convencional, e o produto de PCR é detectado pela emissão de fluorescência (APPLIED BIOSYSTEMS, 2012).

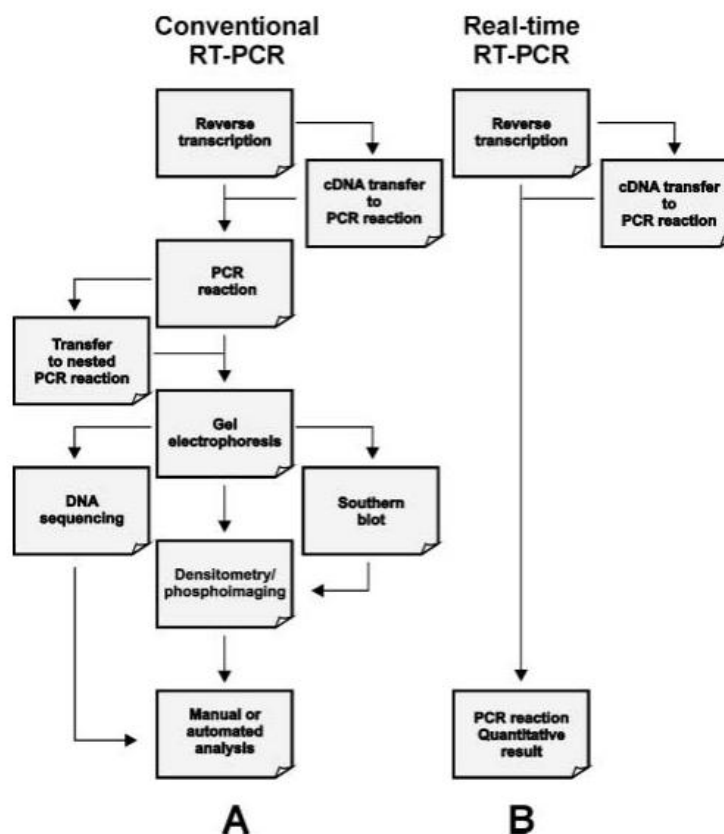


Figura 5. Quantificação por RT-PCR. Em A a RT-PCR convencional e em B a RT-PCR em tempo real (BUSTIN, 2000).

Atualmente, o avanço tecnológico para a realização do PCR em tempo real tem aumentado, incluindo novos termocicladores, que possibilitam a obtenção de resultados acurados. Essa tecnologia objetiva minimizar a variabilidade inerente ao PCR convencional e monitora sinais fluorescentes tais como são gerados, além de ser projetada para o menor uso de reagente e amostra (BUSTIN, 2002). No tocante à instrumentação para a realização do PCR em tempo real, é necessária uma plataforma que contenha um termociclador, com um sistema ótico para a excitação da fluorescência e coleta da emissão, e também um computador com um software para a aquisição de dados e análise final da reação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Segundo Bustin (2005), o princípio da quantificação por esse método é simples: cópias de alvo estão presentes no início do ensaio e poucos ciclos de amplificação são necessários para gerar o número de fragmentos amplificados que podem ser detectados de forma confiável. Consequentemente, poucos ciclos de amplificação são necessários para que a fluorescência alcance o nível de limiar da linha de detecção.

Nesse trabalho, foi utilizado como sistema de detecção o corante SYBR® Green. O Sybr Green se liga entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma luz verde (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Quando monitorada em tempo real, essa reação resulta em um aumento no sinal de fluorescência, que pode ser observado no estágio de polimerização e que cessa quando o DNA é desnaturado (BUSTIN, 2000).

É possível observar um ponto no gráfico gerado pelo programa do aparelho de PCR em tempo real, denominado *Cycle Threshold (Ct)* que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial, apresentando valores logarítmicos que são utilizados em análises quantitativas. Além disso, há a possibilidade também de analisar dados por PCR em tempo real por duas formas: por quantificação absoluta ou por quantificação relativa (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A quantificação absoluta determina o número de cópias relacionado com o sinal da curva padrão, ao passo que a quantificação relativa relaciona a transcrição do gene alvo com o número de cópias de outro transcrito (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Se há interesse em observar mudanças na expressão gênica, realiza-se uma quantificação relativa, isto é, a expressão do gene alvo é comparada com a expressão de um gene de referência (gene de expressão constitutiva) (PFAFFL et al., 2001) citado por Beloti (2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal e Condução Experimental

O experimento de deficiência hídrica das cultivares de cana-de-açúcar tolerante (RB867515) (EMBRAPA, 2013) e sensível à seca (SP86-155) (COPERSUCAR, 1999; CTC, 2007), foi conduzido em casa de vegetação, sob condições de temperatura e umidade controladas. O modelo da casa de vegetação é do tipo “Poly Venlo” (Van der Hoeven), apresenta 3,5 m de altura, com cortina de sombreamento (tela termo-refletores aluminizada – malha 50% de sombra) fixa na lateral externa e de cortina dotada de sombreamento móvel no teto, possui também sistema de resfriamento e umidificação e ventiladores para eliminação do ar quente. Sua localidade fica no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, no município de Jaboticabal-SP.

Este experimento foi desenvolvido entre os meses de setembro de 2008 a abril de 2009, período este onde a média da temperatura foi de $27,39^{\circ}\text{C} \pm 2,31^{\circ}\text{C}$, com máxima de $31^{\circ}\text{C} \pm 2,38^{\circ}\text{C}$ e mínima de $22,19^{\circ}\text{C} \pm 1,94^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar com variação de $60,44 \pm 17,44\%$. O delineamento experimental utilizado foi realizado em blocos ao acaso, num esquema fatorial $2 \times 2 \times 4$, com duas cultivares (RB867515 e SP86-155), dois tratamentos (com e sem deficiência hídrica) e quatro épocas de amostragem (1, 3, 5 e 10 dias de deficiência hídrica), sendo realizado quatro repetições, totalizando 64 amostras.

As plantas utilizadas neste trabalho foram originadas a partir de mini-toletes de colmo de cana-de-açúcar com uma única gema, os quais apresentavam aproximadamente 7 cm de comprimento. Estes foram tratados com 0,25% de fungicida sistêmico Piori Xtra® (Syngenta). Aproximadamente 14 a 16 mini-toletes foram plantados em bandejas plásticas (30 cm x 20 cm x 10 cm) contendo areia peneirada. Realizou-se a rega diariamente até o desenvolvimento e brotação das mudas.

Em torno de trinta dias de plantio, as mudas homogêneas (com melhores características da parte aérea e raízes) foram transplantadas para vasos de plástico

de 14,5 L, uma muda por vaso, os quais continham solo Argissolo Vermelho-Amarelo, proveniente do município de Catanduva. De acordo com Dedemo (2011), este solo é representativo da região Noroeste do Estado de São Paulo, atual região de expansão da cultura de cana-de-açúcar. Inicialmente, este solo foi submetido à calagem e à correção de nutrientes (Tabela 1).

Para isto, realizou-se a adição de 50 g de cal; 200 g da fórmula NPK 04-30-20; 0,5 g de sulfato de cobre; 1,25 g de sulfato de zinco; 2,5 g de sulfato de ferro e 1,5 g de Bórax (borato de sódio) em cada 500 L de solo seco e peneirado. Ao longo de seis meses de desenvolvimento e crescimento destas plantas, as mesmas receberam uma nova adubação, solução aquosa de ureia a 4% sobre o solo.

A irrigação dos vasos foi feita utilizando-se duas metodologias: atmômetro de *Livingston* e pesagem dos vasos. Estas medidas foram tomadas no máximo a cada dois dias, sendo que a umidade do solo foi mantida na faixa de 65 a 75% da capacidade de campo (CC). O atmômetro de *Livingston* permite estimar a evapotranspiração (ET), através da variação do volume de água (ΔV_a) em milímetros (mm) no reservatório (PORTO et al., 2000 e BRONER; LAW, 1991), citado por Dedemo (2011).

Evapotranspiração é o processo simultâneo de transferência de água para a atmosfera por evaporação da água do solo, superfícies livres de água e água retida pelas plantas e pela transpiração das plantas. A evapotranspiração de referência no interior de ambiente protegido é sempre inferior, ficando entre 45% e 77% da verificada para o meio exterior (FARIAS; BERGAMASCHI; MARTINS, 1994). Para Prados (1986), Rosenberg, McKenney e Martin (1989) e Braga e Klar (2000), a evapotranspiração no interior fica em torno de 60% a 80% daquela verificada fora de estufa plástica. A evapotranspiração foi estimada pela fórmula abaixo:

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

O valor de 23,76 mL foi originado a partir do cálculo que levou em consideração: $\phi_{\text{sup.}}$ = Diâmetro superior do vaso; Kc = Coeficiente cultural de 40 %

Tabela 1. Caracterização físico-química de amostra do Argissolo Vermelho-Amarelo após a calagem e a correção de nutrientes.

Caracterização Química **																
pH	M.O.*	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB*	T*	V*	B	Cu	Fe	Mn	Zn	S-SO ₄	Al
em CaCl ₂	em g.dm-3	(resina) mg.dm-3					mmol _c .dm ⁻³		%				mg.dm ⁻³			mmolc.dm-3
5,7	12	68	10	24	15	15	49	64	77	0,4	0,6	8	14	0,9		0

Caracterização Física**				
Argila	Limo	Areia		Classe Textual
		Fina	Grossa	
g.Kg ⁻¹				
169	35	622	174	Média

* M.O.: Matéria Orgânica; SB: Soma de Bases; T: Capacidade de troca de Cátions; V.: Saturação por Bases. ** Análise realizada no Laboratório de Análise de Solo e Planta, do Departamento de Solos e Aduos, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, São Paulo.

Já a metodologia de pesagem foi realizada apenas para alguns vasos, os quais deveriam ser mantidos entre 18,49 Kg (65% CC) e 18,95 Kg (75% CC), considerando-se a massa de todo o conjunto “vaso (vazio) + solo (seco) + planta (valor médio da massa fresca tanto da parte aérea quanto das raízes) + água (volume na CC, sendo a densidade da água igual a 1)”.

Aos 175 dias após o plantio (DAP), iniciaram-se os tratamentos de deficiência hídrica por 4 épocas de amostragem (1, 3, 5 e 10 dias). Neste mesmo período, as plantas controles tiveram a rega adequada (65-75% CC), sendo coletadas em conjunto com as estressadas. Em cada época de amostragem, as cultivares (estressada e sua controle) tiveram apenas poucos minutos de diferença entre uma coleta e outra, normalizando qualquer possível diferença entre elas.

Sendo assim, nos dias de coleta também foram determinados o volume de água presente nos poros do solo, pesou-se os vasos das quatro repetições após a retirada da parte aérea das plantas, subtraindo o valor do vaso vazio e a média do volume de raízes.

4.2. Coleta das raízes de cana-de-açúcar

Em cada época de amostragem, foram coletadas as raízes das plantas estressadas e posteriormente as controles de suas respectivas cultivares. As raízes foram lavadas rapidamente com água de torneira, seguida de outra lavagem com água ultrapura MilliQ. Após, as mesmas foram cortadas em pedaços menores com a ajuda de estiletes devidamente tratados contra RNase (imersão em solução a 3% de hipoclorito de sódio por 30 min), logo foram envolvidas em papel alumínio já etiquetados e transferidos rapidamente para o nitrogênio líquido, sendo armazenadas em freezer a -80°C até o momento de sua utilização para a extração do RNA total (Figura 6).



Figura 6. Coleta das raízes de cana-de-açúcar tolerante e sensível à seca.

4.3. Determinação do Teor de Prolina Livre

As cultivares de cana-de-açúcar tolerante (RB867515) e sensível (SP86-155) ao déficit hídrico tiveram a prolina ($C_5H_9NO_2$) quantificada segundo a metodologia de Bates et al. (1973), com as adaptações descritas a seguir.

Foram utilizados 0,125 g de tecido fresco da raiz, das quatro repetições de cada cultivar, tanto das plantas estressadas quanto das plantas controles, totalizando em 0,5 g cada. Este material foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido, após acrescentou-se 2 mL de ácido sulfosalicílico ($C_3H_6O_3SO_3 \cdot 2H_2O$) a 3% (m/v) (Vetec), com posterior adição de mais 8 mL do mesmo ácido, realizando-se uma homogeneização, a qual foi filtrada (Whatman n°2) duas vezes para a retirada dos interferentes.

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 2 mL do filtrado que reagiram com 2 mL de ácido ninhidrina [1,25g ninhidrina ($C_9H_4O_3 \cdot H_2O$ - Vetec); 30 mL de ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$ - Vetec), 20 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4 6M - Vetec)] e 2 mL de ácido acético glacial (Vetec) por 1 hora em banho-maria à temperatura de 100°C. Após esta etapa, para que a reação fosse interrompida o tubo de ensaio foi colocado

imediatamente em gelo, por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 4 mL de tolueno (C_7H_8 - Vetec) e a solução foi agitada por 15 a 20 segundos.

Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, retirou-se o sobrenadante e foi realizada a análise do equilíbrio da reação. A amostra branco (livre de prolina) foi realizada conforme o procedimento acima, para eliminar os interferentes de cada solução. A leitura de absorbância das amostras foi realizada no comprimento de onda 520 nm do espectrofotômetro Pharmacia LKB – Ultrospec III, onde a intensidade da cor do cromógeno foi proporcional à concentração de prolina presente na solução em análise.

A curva padrão foi realizada conforme a ordem das diluições dos tubos e das reações da Tabela 2.

Tabela 2. Curva padrão da prolina. A solução estoque de prolina foi preparada com 5800 µg de prolina (Vetec) em 50 mL de ácido sulfosalicílico a 3%, filtrada em Whatman nº 2, aliquoteada e estocada a – 20°C.

Tubos	Solução estoque de prolina (mL)	Ácido sulfosalicílico a 3% (mL)	Reagente de ninidrina (mL)	Ácido acético glacial (mL)	µg de prolina na reação
1	0	2,000	2,0	2,0	0
2	0,010	1,990	2,0	2,0	1,16
3	0,025	1,975	2,0	2,0	2,90
4	0,050	1,950	2,0	2,0	5,80
5	0,100	1,900	2,0	2,0	11,60
6	0,200	1,800	2,0	2,0	23,20
7	0,250	1,750	2,0	2,0	29,00
8	0,500	1,500	2,0	2,0	58,00
9	0,750	1,250	2,0	2,0	87,00
10	1,000	1,000	2,0	2,0	116,00

A mesma foi realizada em duplicata, com os valores da absorbância no comprimento de onda 520nm. Após a leitura da absorbância destas concentrações de prolina, foi feito um gráfico da reta padrão, o qual gerou a equação ($y=0,0296x + 0,0041$) que permitiu transformar os valores de absorbância das amostras em µg de prolina (Figura 7).

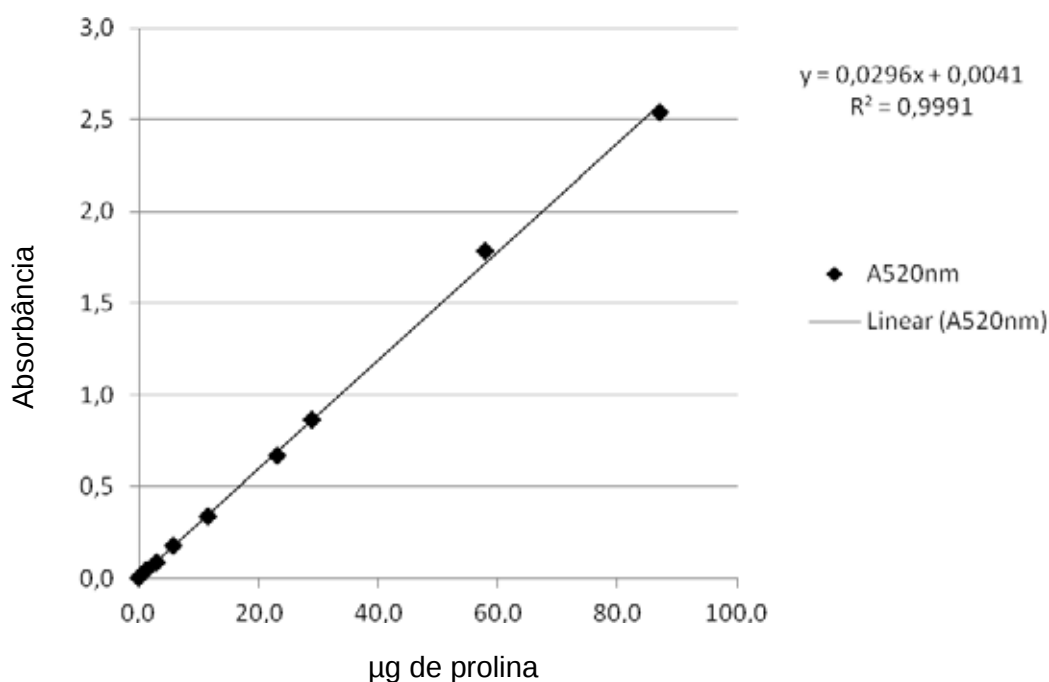


Figura 7. Reta padrão em µg de prolina determinada pela Absorbância no comprimento de onda 520nm.

A determinação dos teores de prolina em $\mu\text{moles.g}^{-1}$, foi realizada em triplicatas para as duas cultivares analisadas sob os diferentes tratamentos, sendo calculada pela fórmula:

$$[(\mu\text{g prolina livre/mL} \times \text{mL tolueno}) / 115,5 \mu\text{g}/\mu\text{mole}] / [(g \text{ amostra}) / 5] = \mu\text{moles de prolina livre/g massa fresca.}$$

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), usando esquema com dois fatores, 2 x 4 (cultivar e estresse) e sua interação.

4.4. Extração do RNA total

Para a extração de RNA total, foi fundamental a preparação inicial das vidrarias e utensílios utilizados na maceração da amostra. Vidrarias como almofariz,

pistilo e espátulas foram revestidas com papel alumínio e mantidas em estufa a 180°C por 6 horas; isto destrói as RNases.

O RNAs totais da raiz das cultivares tolerante e sensível à seca, mais as suas respectivas plantas controle foram extraídos utilizando-se o Kit “*Illustra RNAspin Mini RNA Isolation*” (GE Healthcare), com algumas modificações, como descrito a seguir. Inicialmente foi macerado em nitrogênio líquido 0,6 g de tecido radicular congelado, esta massa foi composta por 0,15 g das quatro repetições biológicas, originando um *pool*. Para que ocorresse a lise celular, adicionou-se 400 µL do Tampão RA1 e em seguida 4 µL de β-mercaptoetanol, agitando-se vigorosamente em vórtex.

Esta mistura foi colocada em um minifiltro RNAspin adicionado ao seu tubo coletor; o mesmo foi centrifugado por 1 min a 11.000 x g. Apenas o sobrenadante foi aplicado em um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, o precipitado (restos celulares e proteínas) foi descartado. Em seguida, adicionou-se 400 µL de etanol 70% ao filtrado e então homogeneizou-se por 5 seg em vórtex por 2 vezes; este passo ajusta as condições para que o RNA se ligue à nova microcoluna.

Todo o conteúdo foi aplicado no centro da microcoluna RNAspin inserida em um tubo coletor de 2,0 mL; centrifugou-se por 30 seg a 8.000 x g. O próximo passo foi a dessalinização da membrana de sílica (MDB), à qual acrescentou-se 350 µL do tampão MDB do kit e centrifugou-se a 11.000 x g por 1 min para a secagem da membrana. O sobrenadante foi descartado e a mesma coluna foi inserida no mesmo tubo coletor. A retirada do sal é importante para que a digestão do DNA com a enzima DNase I seja eficaz.

A enzima DNase foi inicialmente preparada em vários tubos de microcentrífuga estéril com 10 µL da DNase e 90 µL do tampão de reação, homogeneizou-se e congelou-se a -20°C. No momento da sua utilização, esta solução foi descongelada e aplicou-se 95 µL no centro da membrana de sílica da coluna, a qual permaneceu incubada em temperatura ambiente por 15 min. Logo após as amostras tiveram 3 lavagens:

- 1ª adicionou-se 200 µL de tampão RA2 do kit à minicoluna RNAspin, centrifugou-se por 1 min a 11.000 x g (inativação da enzima DNase);
- 2ª adicionou-se 600 µL do tampão RA3 do kit à minicoluna RNAspin, centrifugou-se por 1 min a 11.000 x g. Apenas o sobrenadante foi descartado;

- 3ª adicionou-se 250 µL do tampão RA3 do kit à minicoluna RNAspin, centrifugou-se por 2 min a 11.000 x g para secar toda a membrana. A coluna foi colocada em um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL livre de nucleases.

E por fim, o RNA total foi eluído em 100 µL de água livre de RNase fornecida pelo kit por meio de uma centrifugação a 11.000 x g por 1 min, posteriormente foi estocado a - 80°C.

4.5. Quantificação do RNA total

Após o término da extração de RNA total, todas as amostras foram quantificadas em um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) através da leitura de absorbância nos comprimentos de onda 260 nm, 280 nm e 230 nm. O valor de absorbância a 260 nm determinou a concentração (ng/µL), as razões A260nm/A280nm avaliaram as contaminações por proteínas e A260nm/A230nm avaliaram as contaminações por outros compostos, como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol. Quando estas apresentam relações entre 1,8 a 2,0 e acima de 2,0, respectivamente, podemos considerá-las como de qualidade boa.

4.6. Integridade do RNA total

A integridade bem como as proporções (2:1) das bandas 28 S e 18 S (RNAs ribossomais), respectivamente, de todas as amostras de RNA total foram visualizadas em um gel desnaturante de agarose a 1,5 % (p/v), contendo 6,7 % de formaldeído (v/v). Aplicou-se no gel 1 µg do RNA total seco adicionado a 18 µL da solução contendo 15 µL de tampão de amostra [750 µL de formamida; 150 µL de tampão de corrida 10X (0,2 M MOPS, 80 mM Acetato de Sódio, 10 mM EDTA pH 8,0); 90 µL de formaldeído; quantidade mínima de bromofenol e água-DEPC em q.s.p. 1,125 mL], 0,5 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL) e 2,5 µL de água-DEPC.

A solução mais o RNA total foram aquecidas em banho-maria a 65°C por 7 min antes da aplicação no gel, sendo submetido à eletroforese a 60 V por 50 min. A imagem do gel foi captada por uma câmera CCD (*Esatman Kodak Company*; USA).

Para confirmar a concentração e integridade do RNA, as amostras foram submetidas ao equipamento Agilent Bioanalyzer 2100, que utiliza uma plataforma baseada em microfluidos para correr proteínas, DNA e RNA. Para analisar as amostras de RNA, utilizou-se o Agilent RNA 6000 nano kit, segundo as recomendações do fabricante. As amostras foram individualmente analisadas e imagens de eletroferograma e gel foram criados, determinando o tamanho das bandas, sua quantificação como também a sua integridade. Além disso, o Bioanalyser determina um índice RIN (número de integridade do RNA) que varia de 1 a 10, sendo considerados satisfatórios valores acima de 7.0.

4.7. Síntese dos cDNAs Dupla-Fita

A primeira fita do cDNA foi sintetizada utilizando o *Kit Revertaid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas, Lituânia); a segunda fita foi sintetizada conforme as orientações do mesmo fabricante, ambas com algumas modificações. Foi aliquotado 5 µg do RNA total de cada amostra em tubos estéreis e livres de nucleases. Este material foi completamente seco em uma Speedy Vac por 30 min. Após, foi adicionado a cada tubo 11 µL de água livre de nucleases e as amostras foram homogeneizadas gentilmente e logo mantidas em gelo. Esta homogeneização foi repetida várias vezes, durante aproximadamente 3 horas.

Em seguida, adicionou-se 1 µL de oligonucleotídeo oligo(dT)₁₈ e incubou-se a reação por 5 min a 65°C. Logo, foi adicionado também outros reagentes do kit como 4 µL de tampão de reação 5X; 20 U de *RiboLock™*, o qual é um inibidor de RNase; 2 µL de mix de dNTP a 10 mM; e 200 U da enzima *RevertAid™ H Minus M-MuLV Transcriptase Reverse*. Com cuidado, a reação foi homogeneizada e centrifugada brevemente em microcentrífuga por alguns segundos. Incubou-se a 42°C por 90 min, seguida de uma inativação a 70°C por 5 min, 5 U da enzima RNase H, *E. coli* (Invitrogen Corp., CA, USA) foram adicionados a uma temperatura de 37°C por 22

min. A mesma foi interrompida pela adição de 1 µL da solução de EDTA 0,125 M pH 8,0.

Já o procedimento da síntese da segunda fita do cDNA foi realizado adicionando-se os seguintes reagentes aos 22 µL da primeira reação: 8 µL de tampão de reação 10X da DNA Polimerase I (Fermentas, Lituânia); 30 U da enzima DNA Polimerase I, *E. coli* (Fermentas, Lituânia); adicionou-se água livre de nuclease em q.s.p 100 µL. A reação foi misturada e centrifugada brevemente em microcentrífuga. A mesma foi incubada a 15°C por 2 horas. Em seguida, adicionou-se 12,5 U da enzima T4 DNA Polimerase (Fermentas, Lituânia), seguida da incubação a 15°C por 5 min. Esta reação foi interrompida por meio da adição de 5 µL de EDTA 0,5 M pH 8,0, sendo posteriormente purificados utilizando o método fenol-clorofórmio.

4.8. Purificação dos cDNAs Dupla-Fita pelo Método Fenol-Clorofórmio

Adicionou-se ao tubo da síntese de cDNA dupla-fita 100 µL de tampão TE_{20:1} (20 mM Tris-HCl e 0,1 mM EDTA pH 8,0). Em seguida, adicionou-se também uma mistura de fenol pH 8,0, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, respectivamente. A amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 min e centrifugada a 12.000 x g a 4°C por 15 min. Após, aproximadamente 150 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e este tubo foi colocado no gelo.

Novamente adicionou-se ao tubo inicial mais 100 µL de TE_{20:1}, foi repetido os passos de homogeneização e centrifugação citados acima. Recuperou-se aproximadamente 100 µL de sobrenadante e transferiu-se novamente para o segundo tubo. A este tubo foi adicionado um mesmo volume de clorofórmio, seguido de uma homogeneização em vórtex por 1 min e centrifugação a 12.000 x g a 4°C por 5 min. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um terceiro novo tubo. Sendo realizada mais uma homogeneização e centrifugação a 12.000 x g a 4°C por 5 min do segundo tubo com mais 100 µL de TE_{0,1}. O sobrenadante recuperado foi transferido para o terceiro tubo, ao qual acrescentou-se 1/10 de volume de acetato

de sódio 3 M pH 5,2. A seguir, adicionou-se igual volume de isopropanol gelado e a homogeneização foi realizada por várias inversões dos tubos. Estas amostras foram mantidas por 16 horas em freezer a -20°C.

A lavagem do cDNA foi composta de uma centrifugação a 12.000 x g por 20 min a 4°C. Após, descartou-se o sobrenadante com muito cuidado e adicionou-se ao tubo 500 µL de etanol 70% gelado para a remoção de sais residuais. A homogeneização foi realizada por várias inversões dos tubos, com posterior centrifugação a 12.000 x g por 10 min, a temperatura ambiente. Este procedimento de lavagem foi realizado mais uma vez. Ao descartar todo o sobrenadante, o precipitado foi submetido a secagem por 1 hora em temperatura ambiente e adicionou-se a ele 15 µL de água ultrapura esterilizada. O cDNAs purificados e limpos foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop, o qual permitiu avaliar a boa qualidade de cada amostra, sendo logo em seguida armazenados em ultra freezer -80°C até sua utilização.

4.9. Técnica de cDNA-AFLP

A Técnica de cDNA-AFLP foi realizada por meio do *AFLP® Plant Mapping kit (Regular Plant Genomes)* da PE-Applied Biosystems, Inc., CA, USA (1997), conforme as instruções do fabricante, com algumas modificações.

4.9.1. Reação de Restrição

Esta técnica se inicia com a digestão do cDNA por meio de duas enzimas, uma com corte raro (*EcoRI*) e outra com corte frequente (*MseI*), as quais geram fragmentos com extremidades compatíveis para que ocorra a ligação dos adaptadores *EcoRI* e *MseI* na próxima etapa. A reação de restrição consistiu em 300 ng dos cDNAs dupla-fita; 5 U da enzima *EcoRI* (*Fermentas*, Lituânia); 0,5 U da enzima *MseI* (*Invitrogen Corp.*, CA, USA); 1,25 µL de tampão React 1 10X (*Invitrogen Corp.*, CA, USA) e água ultrapura esterilizada em quantidade suficiente

para 12,5 µL. Foi realizado uma incubação a 37°C por 2 horas, com uma inativação das enzimas a 70°C por 15 min.

4.9.2. Reação de Ligação dos Adaptadores

Inicialmente foram separadas alíquotas de 0,33 µL de cada adaptador *EcoRI* e *MseI*, estas alíquotas foram aquecidas a 95°C por 5 min e resfriadas a temperatura ambiente por 10 min. Os adaptadores foram adicionados em um único tubo para posterior utilização. Cada reação de ligação consistiu em 3,7 µL do cDNA digerido; 0,5 µL de tampão T4 DNA Ligase (*New England Biolabs, Inc*); 80 U da enzima T4 DNA Ligase (*New England Biolabs, Inc*) e 0,66 µL dos adaptadores *EcoRI* e *MseI*. A reação de ligação foi mantida a 20°C por 2 horas em termociclador (MJ Research-Inc.). Ao final desta etapa, a mesma reação foi diluída 3 vezes com tampão TE (10 mM de Tris-HCl e 1,0 mM de EDTA, pH 8,0).

4.9.3. Reação de Amplificação Pré-Seletiva

Nesta reação, foram utilizados 4 µL da reação anterior diluída 3 vezes; 1 µL do mix dos oligonucleotídeos pré-seletivos (*EcoRI* e *MseI*) do kit e 15 µL do *AFPL Amplification Core Mix* (contendo tampão, dNTPs, MgCl₂ e a enzima DNA polimerase) do kit. O programa de amplificação consistiu em: 72°C por 2 min (Início); 94°C por 20 seg (Desnaturação); 56°C por 30 seg (Anelamento); 72°C por 2 min (Extensão) e 60°C por 30 min (Término). Os passos de desnaturação, anelamento e extensão tiveram 20 ciclos.

4.9.4. Reação de Amplificação Seletiva (Modificada para Eletroforese com Gel de Poliacrilamida 6%)

Neste trabalho, foi realizado o cDNA-AFLP em eletroforese com gel de poliacrilamida 6% (p/v) desnaturante, o qual possibilita a retirada das bandas diferencialmente expressas da cultivar tolerante em relação à cultivar sensível.

O kit permite 64 combinações distintas dos oligonucleotídeos *EcoRI* e *MseI*. Para este trabalho, foram escolhidas 9 combinações, as quais apresentaram sucesso em pesquisas com milho (Monocotiledônea). Na Tabela 3, estão as 9 combinações de pares de oligonucleotídeos *EcoRI* e *MseI*.

Tabela 3. Combinações de oligonucleotídeos *EcoRI* e *MseI* utilizadas na técnica de cDNA-AFLP.

Oligonucleotídeo <i>EcoRI</i>	Oligonucleotídeo <i>MseI</i>
AAC	CAG
AGG	CAT
ACT	CTA
ACG	CAC
AGC	CAC
AGG	CTT
AAG	CTT
AAC	CTC
AAG	CTC

Na reação seletiva foram utilizados 2,0 µL dos produtos da reação de amplificação pré-seletiva diluída 4X em tampão TE; 1,5 µL de tampão 10X (200 mM de Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM de KCl); 1,2 µL de MgCl₂ a 25 mM; 1,5 µL de dNTPs a 2,5 mM (*Invitrogen Corp.*, CA, USA); 2,0 µL do oligonucleotídeo *MseI* a 10 µM sem marcação fluorescente (*Sigma Life Science*); 2,0 µL do oligonucleotídeo *EcoRI* a 10 µM sem marcação fluorescente (*Sigma Life Science*); 1,25 U da enzima *Taq* DNA polimerase (*Fermentas*, Lituânia) e água ultrapura esterilizada em q.s.p. 15 µL.

A PCR da amplificação seletiva foi composta por 40 ciclos, mais 10 ciclos *touchdown*, com uma redução gradual da temperatura de anelamento de 66°C para 56°C em 1°C por passo, sendo o passo de 56°C repetido por 30 vezes, e por fim um passo de 60 °C por 30 min (Tabela 4).

Tabela 4. Programa realizado na etapa da PCR de amplificação seletiva, utilizado na técnica de cDNA-AFLP.

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

4.10. Preparo da eletroforese em Gel de Poliacrilamida 6% (7 M ureia) corado com Nitrato de Prata

Inicialmente, foi preparada a solução ureia/acrilamida a 84% de ureia, 40% (acrilamida 30%) e 20% de TBE 10X (891,8 mM de Tris-base; 889,5 mM de Ácido bórico; 25,5 mM de EDTA), de acordo com Sambrook, Fritch e Maniats (1989).

Em seguida, realizou-se os tratamentos das placas de vidro com as soluções Repel e Bind conforme Creste, Tulmann-Neto e Figueira (2001). As mesmas foram previamente limpas e desengorduradas com álcool comercial e acetona.

A placa de vidro Repel (33,3 x 39,4 cm) foi tratada utilizando 1,5 mL da solução 2% *dimethyldichlorosilane em octamethyl cyclo-octasilane (PlusOne Repel-Silane ES) (Amersham Pharmacia Biotech.)*, a qual foi espalhado na placa com cuidado. Este composto permite que a placa possa se soltar do gel com facilidade. Foram necessários 5 min de espera para que a placa ficasse completamente seca. Já a placa de vidro Bind (33,3 x 41,9 cm) foi tratada com 3 mL da solução (5% de ácido acético glacial em 95% de etanol absoluto) mais 7 μ L de *g-methacryloxypropyl-trimethoxysilane (PlusOne Bind Silane) (Amersham Pharmacia Biotech.)*; homogeneizou-se e espalhou-se na placa com cuidado. Aguardou-se 5 min para a secagem da placa.

Com a ajuda de um espaçador de 0,4 mm, as placas já tratadas com as soluções Repel e Bind foram unidas de maneira que as partes tratadas ficassem viradas uma para a outra, as laterais e a parte inferior desta montagem foram lacradas com fita adesiva para impedir o vazamento do gel no momento da aplicação.

Assim, foi aplicado com uma seringa de 60 mL a solução do gel (70 mL da solução ureia/acrilamida; 750 μ L de 10% persulfato de amônio e 45 μ L de TEMED) no aparato acima contendo as presilhas nas laterais das placas. Terminada a aplicação, o pente invertido foi inserido. Estas presilhas dificultam a formação de bolhas no gel ao inserir o pente. Aguardou-se 1 hora para a polimerização do gel.

Passado este período, toda a montagem foi lavada em água corrente de torneira e inserida na cuba eletroforética vertical da marca C.B.S. Scientific. Utilizou-se aproximadamente 2L de tampão TBE 1X (89,2 mM Tris-base; 88,9 mM de Ácido bórico; 2,5 mM de EDTA). Retirou-se o pente e fez-se uma limpeza na canaleta com o próprio tampão de corrida, retirando bolhas superficiais e resíduos de ureia; o pente foi então inserido com os dentes virados para o gel. A pré-corrida foi realizada a 90 W por aproximadamente 50 min, ou seja, até que a temperatura da placa atingisse 53°C.

Neste período da pré-corrida, foram preparadas as amostras dos produtos da PCR Seletiva e os marcadores de tamanho molecular. Foram utilizados 3 marcadores com tamanhos diferentes, 1 Kb DNA *Ladder* (Fermentas, Lituânia), O' *RangeRuler*TM 50 pb DNA *Ladder* (Fermentas, Lituânia) e 10 pb DNA *Ladder*

(Invitrogen Corp., CA, USA). A todos eles foram adicionados tampão de desnaturação [10 mM de NaOH; 0,05% de xileno cianol (p/v); 0,05% de azul de bromofenol (p/v); 20 mM de EDTA em formamida] na razão de 1:0,5 (produto de PCR ou marcador: tampão de desnaturação).

Foi realizada a desnaturação destas amostras e dos marcadores em um termociclador (MJ Research-Inc.) a 95°C por 5 min e rapidamente colocados no gelo até a aplicação no gel. Foram aplicados no gel 4 µL, tanto das amostras quanto dos marcadores moleculares; os marcadores moleculares foram aplicados em ambas as laterais do gel. A corrida foi realizada a 55 W por aproximadamente 2 horas, a temperatura da placa ficou a 47°C.

Terminado esta etapa, a placa Repel é separada do gel com a ajuda de uma espátula e logo em seguida o gel, que fica fixado à placa Bind, foi colocado em uma bandeja plástica e sob agitação moderada prosseguiu-se as seguintes etapas:

- 10 min de agitação com 1L da solução fixadora (etanol 10% e ácido acético 1%) (Fixação);
- a solução acima foi descartada e o gel foi lavado com 1 L de água destilada por 1 min;
- 3 min de agitação com 1 L da solução de ácido nítrico (Pré-tratamento – oxidação);
- a solução acima foi descartada e o gel foi lavado com 1 L de água destilada por 1 min;
- 20 min de agitação com 1 L da solução de nitrato de prata (AgNO_3) 0,2% (Impregnação);
- a solução acima foi descartada e o gel foi lavado com 1 L de água destilada por 1 min;
- adicionou-se 540 µL de formaldeído 37% à solução de carbonato de sódio Na_2CO_3 (30g/L), homogeneizou-se, e aproximadamente 300 mL desta solução foi utilizada para banhar a placa toda até o escurecimento desta solução. Após esta ser descartada, o restante da solução (700 mL) foi utilizado até a coloração ideal. Este passo foi realizado sob agitação manual e a duração foi em torno de 10 min (Revelação);

- 5 min de agitação com uma solução *stop* (ácido acético 5%); esta solução é capaz de bloquear a reação da solução reveladora;
- 7 min de lavagem do gel com água de torneira;
- 12 horas de secagem do gel em temperatura ambiente.

Todo o procedimento descrito acima foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da UNESP de Jaboticabal.

4.11. Análise Visual e Obtenção dos Fragmentos Diferencialmente Expressos da Cultivar Tolerante Estressada (FDE-CvTE)

A análise visual do gel de poliacrilamida 6% foi realizada através de um transiluminador de luz branca. Inicialmente, foram analisados os marcadores moleculares, determinou-se a distância em centímetros das principais bandas dos marcadores com o auxílio de uma régua, sendo calculado entre o topo do gel e o centro de cada banda. Corrêa e Possik (2011) afirmam que uma molécula migra na matriz com mobilidade inversamente proporcional ao $\log_{10}$ da sua massa molecular, o qual é função do tamanho e da forma da molécula.

Com estes dados é possível a realização de uma regressão linear dos logaritmos dos valores do tamanho molecular com as distâncias por eles percorridas (PERES; DINIZ, 2011). Assim, fez-se a análise dos FDE-CvTE: a contagem e a medição em centímetros, conforme descrito acima, para determinar o peso molecular de cada banda.

Selecionou-se os fragmentos diferencialmente expressos da cultivar tolerante estressada (RB867515) sob deficiência hídrica quando não havia nenhuma expressão gênica em sua cultivar controle assim como também na cultivar sensível (SP86-155) estressada e sua respectiva controle.

Conforme descrito em Pathan et al. (2007), estes fragmentos (bandas) foram retirados do gel previamente reidratado com uma lâmina de bisturi e logo foram eluídos em 50 μ L de tampão TE (10 mM de Tris-HCl e 1,0 mM de EDTA, pH 8,0), incubados a 4°C por 16 horas, 60°C por 2 horas e 3 ciclos de congela e descongela,

centrifugou-se rapidamente. As amostras foram estocadas a -20°C por no máximo dois dias, sendo posteriormente reamplificadas com o mesmo ciclo do item 4.9.4, mas com algumas modificações no preparo da reação: 10 µL do FDE-CvTE eluídos do gel; 5,0 µL de MgCl₂ a 25 mM (*Fermentas*, Lituânia); 1,0 µL de dNTPs a 10 mM (*Invitrogen Corp.*, CA, USA); 1,0 µL do oligonucleotídeo *EcoRI* a 10 µM sem marcação fluorescente (*Sigma Life Science*); 1,0 µL do oligonucleotídeo *MseI* a 10 µM sem marcação fluorescente (*Sigma Life Science*); 1,25 U da enzima *Taq* DNA polimerase (*Fermentas*, Lituânia); e água ultrapura esterilizada em q.s.p. 50 µL.

A confirmação da amplificação dos mesmos foi dada por meio da eletroforese de 8 µL da reação acima em gel de agarose a 1% (p/v).

4.12. Purificação dos FDE-CvTE recuperados do gel de poliacrilamida 6%

Os fragmentos reamplificados que apresentaram tamanhos em torno do esperado, conforme seus respectivos tamanhos no gel de poliacrilamida 6%, foram selecionados e purificados segundo as instruções do fabricante do kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean up system* (*Promega*, Alemanha). Após, o produto final de cada amostra foi quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*). Todas as amostras estavam com boa qualidade.

4.13. Clonagem dos FDE-CvTE

A clonagem foi realizada utilizando um vetor linearizado pGEM®-T *Easy Vector System I* (*Promega*, Alemanha) que possui apenas uma timina no terminal 3' das duas extremidades. Esta timina tem a função de impedir que o vetor faça a recircularização, além de refinar a eficiência da ligação dos produtos de PCR que possuem também uma adenina adicional em sua extremidade, a qual foi gerada pela utilização da *Taq* DNA polimerase.

A reação de ligação ao vetor consistiu em 75 ng do FDE-CvTE purificado; 25 ng do vetor pGEM®-T *Easy*; 5,0 µL de tampão de ligação 2x da T4 DNA Ligase do

kit; 3,0 U da enzima T4 DNA Ligase do kit e água ultrapura esterilizada em q.s.p. 10 µL. Esta reação foi mantida em termociclador (MJ Research-Inc.) a 4°C por 17 horas.

4.14. Preparo das células de *E. coli* (DH10B) quimicamente competentes

Para a obtenção de colônias isoladas, as bactérias (*E. coli* DH10B) foram plaqueadas em meio sólido 2xTY (16 g de Triptona, 10 g de Extrato de Levedura, 5 g de NaCl em q.s.p. 1.000 mL, pH 7,4) contendo antibiótico estreptomicina a 10 mg/mL.

Após, foi realizado o inóculo de uma colônia isolada em 15 mL de meio 2xTY contendo 10 mg/mL de estreptomicina. Incubou-se a 37°C por aproximadamente 14 horas com agitação moderada de 250 rpm na centrífuga Hitachi (High-Speed Refrigerated CR22GIII Hitack Koki Co., Ltd.). Inoculou-se 4 mL do pré-inóculo em 400 mL de 2xTY contendo 10 mg/mL de estreptomicina em Erlenmeyer de 2.000 mL (inóculo), sob as mesmas condições de temperatura e agitação até que a densidade óptica a 600 nm estivesse entre 0,370 – 0,450.

Sendo assim, transferiu-se a cultura para um tubo de centrífuga de 450 mL, o qual ficou no gelo entre 5-10min. Centrifugou-se a 10.000 rpm (mesma centrífuga Hitachi) durante 10min, a 4°C; descartou-se o sobrenadante com cuidado e ressuspendeu-se o precipitado de bactéria em 100 mL de solução de CaCl₂ (60 mM de CaCl₂, 15% Glicerol, 10 mM de Pipes, pH 7.0) gelada, com posterior centrifugação a 10.000 rpm (mesma centrífuga Hitachi) durante 10min, a 4°C. Novamente descartou-se o sobrenadante, com cuidado, ressuspendeu-se o precipitado de bactéria em 10 mL de solução de CaCl₂ gelada em tubo de centrífuga de 50 mL, com posterior centrifugação a 10.000 rpm (mesma centrífuga Hitachi) durante 10 min, a 4°C. Finalmente, descartou-se mais uma vez o sobrenadante com cuidado e ressuspendeu-se o precipitado de bactéria em 4 mL de solução de CaCl₂ gelada, a 4°C.

Em seguida, aliquotou-se 50 µL da suspensão em tubos eppendorf (mantidos previamente no gelo) e imediatamente os tubos foram armazenados a -80°C. Uma

vez obtido as células quimicamente competentes, as mesmas tiveram a eficiência verificada e comprovada para serem utilizadas na transformação dos FDE-CvTE.

Esta eficiência foi determinada por meio da adição de 10 ng/μL de vetor pUC18 em 50 μL de células quimicamente competentes (*E. coli* DH10B), previamente retirada do freezer -80°C e mantida em gelo. Homogeneizou-se rapidamente, sendo esta reação mantida em gelo por 30 min. Após, provocou-se um choque térmico em banho-maria a 42°C por 30 seg, seguida de gelo novamente por alguns minutos.

Todo o conteúdo foi transferido para 1,0 mL de meio de cultura SOC [1.000 μL de SOB (5 g de Triptona; 1,25 g de Extrato de levedura; 0,13 g de NaCl; 0,05 g KCl; q.s.p. 250 mL com água destilada), adicionados de 40 μL de glicose 20% e 40 μL de MgCl₂ 1M], incubou-se a 37°C, a 220 rpm em *Shaker* (New Brunswick Scientific CO., INC. Edison, N.J., U.S.A.) por 1 hora. Terminado este período, foram adicionados 200 μL /e 100 μL das bactérias crescidas neste meio de cultura em 2 placas de *petri*, respectivamente. A solução bacteriana foi espalhada nas placas já previamente prontas com 25 mL de meio de cultura 2xTY sólido, 50 μg/mL de ampicilina, 40 μL de X-gal 2% e 25 μL IPTG a 100 mM, sendo incubadas a 37°C por 16 horas. O número de transformantes foi em torno de 10⁸, indicando uma boa eficiência de transformação.

4.15. Transformação Química dos FDE-CvTE, Seleção e Estoque dos Clones Positivos

Para a transformação química dos FDE-CvTE foram adicionados 3 μL da reação de ligação ao vetor em 50 μL de células quimicamente competentes (*E. coli* DH10B) previamente retirada do freezer -80°C e mantida em gelo. Homogeneizou-se rapidamente, sendo esta reação mantida em gelo por 30 min. Após, provocou-se um choque térmico em banho-maria a 42°C por 30 seg, seguida de gelo novamente por alguns minutos.

Todo o conteúdo foi transferido para 1,0 mL de meio de cultura SOC, incubou-se a 37°C, a 220 rpm em *Shaker* (New Brunswick Scientific CO., INC. Edison, N.J.,

U.S.A.) por 1 hora. Após, foram adicionados 200 µL e 100 µL das bactérias crescidas neste meio de cultura em 2 placas de *petri*, respectivamente. A solução bacteriana foi espalhada nas placas já previamente prontas com 25 mL de meio de cultura 2xTY sólido, 50 µg/mL de ampicilina, 40 µL de X-gal 2% e 25 µL IPTG a 100 mM, sendo incubadas a 37°C por 16 horas. O aparecimento de muitas colônias brancas indicou sucesso na clonagem.

Selecionou-se os clones (colônias brancas) de cada amostra dos FDE-CvTE. Estes foram coletados com o auxílio de palitos de madeira esterilizados e cultivados em placas tipo ELISA de 96 poços, com 150 µL de meio de cultura 2xTY líquido com 8% de glicerol e 50 µg/mL de antibiótico ampicilina em cada pocinho. As placas tipo Elisa foram seladas com filme adesivo e cada poço foi perfurado com agulha estéril para a aeração da bactéria. Incubou-se as mesmas em *Shaker* (New Brunswick Scientific CO., INC. Edison, N.J., U.S.A.) a 37°C por 16 horas, sob uma agitação de 300 rpm, sendo posteriormente estocados a -80°C.

4.16. Sequenciamento dos clones positivos

4.16.1. Micropreparação de DNA plasmidial

A micropreparação de DNA plasmidial foi realizada através da repicagem dos clones positivos em placas *Deep Well* também de 96 poços, contendo em cada poço 1 mL de meio 2xTY com 50 µg/mL de antibiótico ampicilina. Os clones foram cultivados em *Shaker* (New Brunswick Scientific CO., INC. Edison, N.J., U.S.A.) a 37°C por 22 horas, sob uma agitação de 300 rpm. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4.000 rpm (Hettich Rotina 35 1705-01 Bench-model Centrifuge), a 20°C por 6 min, para a formação do precipitado (precipitado de bactéria). O sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao precipitado de cada poço 140 µL da Solução I (5 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; 6,5 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,5; 2,3 g de glicose; água ultrapura esterilizada em q.s.p. 250 mL). As placas foram seladas com filme adesivo e realizou-se uma agitação em vortex até que todos os precipitados ficassem completamente dissolvidos.

Uma nova centrifugação foi realizada a 20°C, 4.000 rpm (Hettich Rotina 35 1705-01 Bench-model Centrifuge) por 6 min. O sobrenadante foi descartado através da inversão das placas em papel toalha por 2 min, para a retirada do excesso do meio de cultura. Adicionou-se 50 µL da Solução I e as mesmas foram seladas e novamente os precipitados foram dissolvidos sob agitação em vortex. Toda a suspensão foi transferida para uma placa ELISA contendo 2,5 µL de RNase (10 mg/mL) em cada pocinho. Em cada pocinho também foi adicionado 60 µL da Solução II (150 µL de NaOH 10 M; 750 µL de SDS 10%; água ultrapura esterilizada q.s.p. 8,4 mL). As placas já seladas tiveram a solução misturada por várias inversões. Centrifugou-se brevemente a 1.600 rpm (Hettich Rotina 35 1705-01 Bench-model Centrifuge) para que a solução não permanecesse no adesivo do selo.

Adicionou-se 60 µL da Solução III (29,44 g Acetato de potássio; aproximadamente 11,5 mL Ácido acético glacial para pH 5,4; água ultrapura esterilizada q.s.p 100 mL) em cada pocinho. As placas foram seladas e misturou-se por inversão várias vezes. Centrifugou-se brevemente. O selo adesivo foi retirado e as placas foram mantidas em estufa a 90°C por 30 min. Logo, resfriou-se as mesmas em gelo por 7 min, selou-se e centrifugou-se durante 10 min a 4.000 rpm (Hettich Rotina 35 1705-01 Bench-model Centrifuge) em 20°C. O sobrenadante foi transferido com uma pipeta multicanal para uma placa tipo ELISA com filtro, esta etapa foi realizada para aumentar a pureza do DNA plasmidial. Centrifugou-se a 20°C, 4.000 rpm (Hettich Rotina 35 1705-01 Bench-model Centrifuge) por 6 min.

Em cada poço foi adicionado 110 µL de isopropanol, selou-se as placas com selo de alumínio, sendo realizadas várias inversões. Posteriormente, centrifugou-se a 4000 rpm (Hettich Rotina 35 1705-01 Bench-model Centrifuge), 20°C por 45 min. O sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada invertida por alguns segundos (com aceleração e desaceleração igual a 1). As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 15 min para a secagem completa do DNA plasmidial. Assim, cada amostra foi ressuspensa em 60 µL de água ultrapura esterilizada e quantificada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), sendo posteriormente armazenadas a -20°C.

4.16.2. Reação de seqüenciamento

O método realizado foi o da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems – PE, Inc., CA, USA), a qual consistiu em: 100 ng do DNA plasmidial dos FDE-CvTE; 3 µL do tampão *Save Money* (200 mM Tris pH 9,0; 5 mM MgCl₂); 1 µL do oligonucleotídeo T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') a 10 pmoles/ µL; 1 µL de *BigDye Terminator*; água ultrapura esterilizada em q.s.p 10 µL. Foram sequenciados os clones de cada FDE-CvTE para verificar a possibilidade da existência de mais de um tipo de transcrito com o mesmo tamanho molecular da banda recuperada do gel de poliacrilamida 6%. A reação foi submetida a amplificação no termociclador (MJ Research-Inc.) com um ciclo de 96°C por 1 min (Desnaturação inicial); 39 ciclos de 96°C por 15 seg (Desnaturação), 51°C por 15 seg (Anelamento) e 60°C por 4 min (Extensão).

4.16.3. Lavagem das reações para o sequenciamento

As reações foram lavadas inicialmente com a adição de 80 µL de Isopropanol 75% em cada poço. As placas foram seladas com selo de alumínio e tiveram uma incubação em local escuro a 20°C por 15 min, centrifugou-se a 20°C, 4.000 x g por 30 min. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 200 µL de etanol 70% em cada poço da placa, para remoção do sal residual. Centrifugou-se a 20°C, 4.000 x g por 10 min. Esta etapa da lavagem com etanol 70% foi realizada mais uma vez. As placas foram centrifugadas invertidas por alguns segundos (aceleração e desaceleração 1). As amostras foram secas em estufa a 37°C por 15 min.

4.16.4. Sequenciamento dos FDE-CvTE

O sequenciador automático utilizado foi o *Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer* (PE-Applied Biosystems, Inc., CA, USA). Utilizou-se em cada amostra 10 µL de formamida, seguida de desnaturação em termociclador (MJ Research-Inc.) a 95°C por 5 min, colocadas imediatamente no gelo para posterior aplicação no sequenciador.

4.16.5. Análise dos FDE-CvTE

As sequências das amostras dos FDE-CvTE foram analisadas com auxílio da infraestrutura de equipamentos e juntamente com os pesquisadores de informática e bioinformática do CREBIO (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica) da FCAV/UNESP.

Todas as análises foram efetuadas através da utilização de ferramentas de bioinformática, local e via Internet, e bancos de dados oficiais disponíveis publicamente na internet.

As amostras de FDE-CvTE foram analisadas de forma independente. Os cromatogramas resultantes do sequenciamento de DNA de cada amostra foram submetidos a uma estrutura de diretórios individual. Para estas análises foi utilizada a ferramenta *Phred/Phrap/Consed* (EWING; GREEN, 1998), instalada em um Servidor Dell Power Edge 2900 com sistema operacional RedHat Enterprise Linux 5.

As amostras foram inicialmente analisadas quanto à sua qualidade, atribuindo um valor estatístico de possibilidade de erro para cada base, chamado de qualidade *phred*. Neste trabalho foi considerado como qualidade confiável o valor obtido *phred* ≥ 20 (correspondente a 1% de possibilidade de erro). Em seguida, foi aplicado um processo de limpeza, onde são mascarados os vetores e as pontas de sequências de baixa qualidade. As sequências resultantes deste processo são comparadas entre si, a fim de sobrepor as regiões e/ou fragmentos similares, formando sequências contíguas, chamadas neste trabalho de *contigs*, mas que representam

os fragmentos de interesse. O processo descrito também é conhecido como clusterização.

Em cada *contig* formado foi feita a busca pela combinação de oligonucleotídeos específica de cada amostra (oligonucleotídeos definidos na etapa da amplificação seletiva), com auxílio do programa *Consed*, o qual é parte da ferramenta *Phred/Phrap/Consed*. No final deste processo, os cromatogramas de qualidade duvidosa e as sequências com várias repetições destes oligonucleotídeos foram descartados. Foram considerados como *contigs* válidos apenas os que continham os dois oligonucleotídeos, nas extremidades e opostos, limitando o fragmento.

Os *contigs* válidos e as informações de cada um deles foram organizados em planilhas, por tamanho em número de bases de nucleotídeos. A anotação dos resultados foi feita utilizando-se o programa *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), comparando-se as sequências de nucleotídeos destes *contigs* (sequências FASTA dos *contigs*) com os bancos de dados públicos disponibilizados pelo NCBI (*National Center for Biotechnology Information* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), buscando por sequências similares já estudadas. A base de dados utilizada pela ferramenta BLAST disponível para pesquisa no site do NCBI compreende não só o banco de dados do GenBank [mantido pelo NCBI em conjunto com outras grandes organizações internacionais como o *DataBank DNA* do Japão (DDBJ), o *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) da Europa], mas também outros importantes bancos de dados. O NCBI gerencia e armazena as maiores e principais bases de dados biológicas existentes e é a coleção mais completa de dados de sequências de DNA/Proteínas disponíveis no mundo. Tornou-se, portanto, uma importante fonte de informações para anotações e caracterização de informações genéticas, além do que é atualizado diariamente e, em alguns casos, semanalmente.

A ferramenta BLAST trabalha com diferentes algoritmos para comparações específicas. Neste trabalho, foi utilizado um conjunto de recursos para que pudesse ser apresentado o maior número de resultados possível. Primeiramente, foram feitas comparações utilizando-se o algoritmo BLASTX, que traduz dinamicamente uma sequência de nucleotídeos em aminoácidos, nos 6 quadros de leitura possíveis, e

compara com bancos de dados de proteínas. Neste caso, as comparações foram feitas com o banco de dados não redundante de proteínas “nr” (*All non-redundant GenBankCDTranslations+PDB+SwissProt+PIR+PRFexcludingenvironmentalsample from WGSprojects*). Em seguida, foi utilizado o algoritmo TBLASTX, que traduz dinamicamente uma sequência de nucleotídeos em aminoácidos, nos 6 quadros de leitura possíveis, e compara com bancos de dados de nucleotídeos também traduzidos dinamicamente em proteínas, nos 6 quadros de leitura possíveis. Neste caso, foi feito o TBLASTX contra o banco de dados de nucleotídeos “EST” (*DatabaseofGenBank+EMBL+DDBJsequencesfrom EST Divisions*).

Complementando estes dois resultados, foram feitas as comparações das sequências dos *contigs* com o banco de dados de transcritos únicos gerados no projeto SUCEST (VETTORE et al., 2003), a fim de identificar se a sequência do *contig* resultante do experimento já foi identificada no projeto SUCEST. Para isso, foi utilizado o algoritmo BLASTN, que compara uma sequência de nucleotídeos com um banco de dados de nucleotídeos. Tanto a ferramenta BLAST bem como os dados dos SUCEST, estão disponíveis publicamente no site atual do projeto (<http://sucest-fun.org/>).

Nos casos em que os *contigs* formados tiveram tamanhos onde não se observaram resultados significativos nos bancos de dados do NCBI-BLAST, foi efetuada a busca por um transcrito único correspondente do SUCEST, desde que este apresentasse excelente alinhamento e resultado de *Expected Value* (*e-value*: estatística de probabilidade de erro do alinhamento do BLAST). Foram aceitáveis apenas os *e-value* acima de -08. Em caso positivo, o transcrito correspondente do SUCEST foi utilizado para estender a sequência e validar o resultado nas comparações com os bancos de dados do NCBI-BLAST. Os FDE-CvTE analisados foram categorizados através de pesquisas nas ferramentas disponíveis no site (<http://www.uniprot.org>).

4.16. Validação dos resultados por PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

4.16.1. Síntese de cDNA, desenho dos oligonucleotídeos e PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

Inicialmente, foram sintetizados os cDNAs de fita simples a partir de 5 µg do *pool* de RNA total (4 repetições biológicas) de cada época de amostragem, tanto das plantas controle quanto das estressadas de cada cultivar analisada. Este procedimento foi realizado com oligonucleotídeos randômicos do kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas), segundo as recomendações do fabricante.

A Tabela 5 mostra os oligonucleotídeos iniciadores dos genes de referência codificantes de Proteína 14-3-3 (clone SCCSD2C03A12.g - CA297824); actina (clone SCMCLV1032G08.g - CA299974) e beta-tubulina (clone SCEZFL4046D04.g - CA222437) e dos genes alvos que codificam Proteína dissulfeto isomerase, Trealose, HSP70 e proteína não classificada. Os genes de referência foram desenhados a partir de sequências de nucleotídeos obtidas pelo banco de dados *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e os genes alvos a partir das sequências *fastas*.

Estas sequências passaram por uma análise de bioinformática, utilizando o programa *Repeat Masker* (www.repeatmasker.org/). Este programa mascara as sequências adicionando um N nas regiões que são homólogas com partes do genoma. A partir daí, foi realizado o desenho dos oligonucleotídeos utilizando o programa *Oligonucleotídeo Express* versão 3.0 (*Applied Biosystems*, Foster, CA, USA), obedecendo as regras do programa como tamanho entre 20 e 25 pares de bases, temperatura de anelamento entre 55°C e 60°C e concentração de GC superior a 50%.

Tabela 5. Sequencia dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes de referência e genes alvos utilizados na RT-qPCR.

PROTEÍNA	NOME DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS
Proteína 14-3-3	14-3-3 – F	5' gAg CCA gAT CAg CAA gAg CAA T 3'
	14-3-3 – R	5' gCg gAg AgC ACC ATg AAT g 3'
Actina	ACT – F	5' ATg gAg gCT gCT ggA ATC C 3'
	ACT – R	5' ATC CAC gTC gCA CTT CAT gA 3'
β -Tubulina	β -TUB – F	5' ggA ggA gTA CCC TgA CAg AAT gA 3'
	β -TUB – R	5' CAg TAT Cgg AAA CCT TTg gTg 3'
Proteína Dissulfeto Isomerase	PROT_DISSUL_ISO – F	5' Atg ACT TTg gCC ACA CTT TgC 3'
	PROT_DISSUL_ISO – R	5' ggC CTC TCC ACA gCT gCA T 3'
Trealose	TREALOSE – F	5' TgC CTg CTC ACC ATC gTT 3'
	TREALOSE – R	5' TCA Agg TTC CAC ggg TTT AC 3'
HSP70	HSP70 – F	5' CAA AAg ggA gAC ATC gAA ggT A 3'
	HSP70 – R	5' ggT gAg CTC AAC gTC TTg ATC 3'
Não classificado (fragmento nº 48)	NO HITS – F	5' TTg CgC ACC TTg TCC TTg T 3'
	NO HITS – R	5' Agg CCC gCg CTA TTg TC 3'

Para que a RT-qPCR ocorra em alta eficiência e sem a formação de dímeros, foram realizadas titulações dos oligonucleotídeos iniciadores. Na titulação foi fixada uma concentração de cDNA de 150 ng e variou-se as concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores, conforme exemplificado na Tabela 6.

Tabela 6. Variações das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas nas titulações.

Iniciadores Reversos (nM)	Iniciadores Diretos (nM)			
		100	300	600
100		100/100	100/300	100/600
300		300/100	300/300	300/600
600		600/100	600/300	600/600

Foram realizadas 3 réplicas destas 9 combinações de concentrações de oligonucleotídeos iniciadores diretos e reversos. Além disso, realizou-se também 3 réplicas do controle negativo (água no lugar do cDNA) nas concentrações de oligonucleotídeos iniciadores diretos e reversos (100/100, 300/300 e 600/600). As reações foram submetidas ao aparelho *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR* utilizando-se o kit SYBR Green Power Master Mix (*Applied Biosystems, Foster, CA, USA*) – o qual contém os reagentes necessários para uma PCR, bem como o fluoróforo que emite energia quando se intercala na dupla fita de DNA, além dos oligonucleotídeos específicos. A reação consistiu em 6,5 µL de Syber Green; 1,25 µL de oligonucleotídeo F, 1,25 µL de oligonucleotídeo R; 1 µL do pool de cDNA dos controles das duas cultivares analisadas (150 ng) e água ultra pura para um volume final de 12,5 µL. Os parâmetros utilizados nas amplificações foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

Em experimentos que utilizam SYBR Green como fluorescência repórter, é necessária a construção de uma curva de dissociação, a qual é realizada automaticamente pelos equipamentos ao final da reação de qPCR. Esta curva é

necessária para a certificação da especificidade do oligonucleotídeo à molécula alvo e identificação de possíveis contaminações na reação, já que o SYBR Green liga-se inespecificamente a qualquer molécula de DNA de fita dupla.

No entanto, a eficiência de amplificação de cada gene foi calculada por meio da construção de uma curva de diluição em série de 2:1 dos cDNAs das cultivares tolerante e sensível das plantas controle, com 7 pontos (200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng e 3,13 ng). Foram determinados 7 pontos de diluição para que houvesse uma margem de segurança, sendo que a eficiência de amplificação pode ser calculada com o mínimo de 5 pontos. Os resultados de todas as curvas padrão foram analisados no mesmo programa *Applied Biosystems 7500 real-time PCR*, sendo consideradas eficientes aquelas reações que apresentaram valores de R^2 igual a 0,99 (pipetagem precisa) e EFF%: 90 a 110% (eficiência aceitável) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2012).

Após estas etapas foram realizadas as RT-qPCR para as análises do ΔCt . A reação consistiu em 6,5 μ L de Sybr Green; 1,25 μ L de oligonucleotídeo F, 1,25 μ L de oligonucleotídeo R; 1 μ L do pool de cDNA dos controles para cada cultivar analisada (100 ng) e água ultra pura para um volume final de 12,5 μ L. Os parâmetros utilizados nas amplificações foram os mesmos já citados acima. Em todos os casos, os controles negativos para a PCR foram inclusos e após o término das reações, os resultados foram analisados no programa Expression Suite Software v1.01 (*Applied Biosystems, Foster, CA, USA*), o qual gerou uma planilha com os respectivos Ct (*Cycle threshold* – ciclo de início da detecção do produto amplificado) de cada gene alvo e endógeno. A normalização dos controles endógenos foi realizada no mesmo programa, o qual disponibiliza os valores do Score. Estes valores ou pontuações (Score) são medidas de estabilidade da expressão de um candidato ou controle endógeno em comparação com todos os outros candidatos selecionados ou controles endógenos, sendo considerados satisfatórios valores menores que 1,5 (EXPRESSION SUIT SOFTWARE HELP, 2012; VANDESOMPELE et al., 2002). Além deste programa de normalização, foi utilizado também o NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTTOFT, 2004), este programa gera valores da estabilidade de cada gene, além de indicar o melhor gene endógeno.

Os dados obtidos foram analisados de uma maneira relativa, utilizando a metodologia do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Este método de análise apresenta os resultados em relação ao ΔC_t de um gene normalizador. Para cada tratamento (estressada e controle) foi detectado o valor de C_t , tanto para o gene alvo quanto para o de referência. Este valor representa o ponto em que o sinal de amplificação foi detectado. O valor do C_t do gene alvo foi subtraído do valor da média do C_t dos três genes de referência para ajustar a reação nos diferentes tratamentos e em cada cultivar analisada, sendo obtido o valor de ΔC_t . O valor de ΔC_t de cada gene alvo do tratamento (planta stressada) foi subtraído do valor do ΔC_t da amostra controle (calibrador – planta controle) para cada cultivar analisada, tendo-se o valor de $\Delta\Delta C_t$. Este valor foi utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do gene de referência, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Escolha do material vegetal

A razão para a escolha das raízes como material vegetal no estudo da expressão gênica entre cultivares de cana-de-açúcar contrastantes (tolerante e sensível) à seca foi devido ao fato da raiz ser o primeiro tecido da planta a detectar a falta de água no solo através do contato físico-químico e sinalizar bioquimicamente às demais células, tecidos e órgãos da planta a deficiência hídrica. Esta sinalização pode auxiliar nos ajustes metabólicos e celulares de maneira que a planta se adapte às novas condições ambientais, mantendo suas estruturas para um posterior crescimento e desenvolvimento quando as mesmas se encontrarem em condições ambientais favoráveis. Em situações de deficiência hídrica, Taiz e Zeiger (2004) afirmam que muitas plantas produzem alterações que podem prevenir e tolerar a perda de água, sendo que as raízes funcionam como sensores aos efeitos deste estresse.

5.2. Déficit hídrico em cana-de-açúcar

Para confirmar que as duas cultivares de cana-de-açúcar contrastantes à seca, a RB867515 (tolerante) e a SP86-155 (sensível) estavam sob deficiência hídrica, os vasos foram pesados como descrito em materiais e métodos. Nas Figuras 8 e 9 podemos observar que houve uma redução gradual da porcentagem do volume de água presente nos solos das plantas estressadas, comparadas às plantas controles, conforme os dias de amostragem.

Em nosso experimento, as plantas estressadas das duas cultivares analisadas tiveram no início do tratamento com 1 dia de deficiência hídrica uma CC de 60%, ou seja, valores de água presente no solo que estavam abaixo da faixa de 65 a 75% da capacidade de campo determinada. Aos 3 dias de deficiência hídrica, a CC passou para 50% e aos 5 dias de deficiência hídrica a CC foi aproximadamente

43%. Podemos dizer que dentro desta faixa o estresse foi moderado, se tornando severo aos 10 dias de deficiência hídrica, com aproximadamente 23% da CC.

Estes níveis de estresses foram determinados em conjunto com as mudanças nos aspectos fenotípicos das plantas sob os tratamentos, sendo que a cultivar sensível estressada apresentou folhas amareladas, murchas e enroladas já a partir do 5º dia de deficiência hídrica (estresse moderado) quando comparada com seu controle. No entanto, a cultivar tolerante estressada se manteve com características de crescimento rápido e ereto nesta mesma época de amostragem, tendo se diferenciado de sua planta controle a partir do 10º dia de tratamento (estresse severo) (Figura 10).

Em outros estudos com estresse hídrico em cana-de-açúcar, Ferro (2008), trabalhando com a cultivar SP80-3280 (reconhecida pelo alto teor de sacarose e produtividade em soqueira e com resistência ao carvão, mosaico e ferrugem), avaliou que a deficiência hídrica total até o nono dia (10,5% CC) foi moderada, se tornando severa entre o nono e o décimo sétimo dia (0% CC), tendo sido estabelecida a CC de 70% como adequada para a planta. Alguns pesquisadores trabalharam com níveis de deficiência hídrica previamente estipulados, como exemplo Carlin e Santos (2009), que realizaram um experimento de deficiência hídrica em cana-de-açúcar através dos valores de microporosidade do solo, onde estabeleceu-se a CC em 70% da microporosidade, considerada adequada para a maioria das plantas cultivadas. A quantidade de água a ser adicionada foi calculada para cada tratamento de disponibilidade hídrica: sem estresse (70% CC, 1,89 L), estresse moderado (55% CC, 1,49 L) e estresse severo (40% CC, 1,08 L). Queiroz et al. (2008) também trabalharam com estresse hídrico em cana-de-açúcar sob três níveis de disponibilidade hídrica do solo (DHS), 55% (DHS1 = sem estresse), 40% (DHS2 = estresse moderado) e 25% (DHS3 = estresse severo) de poros preenchidos com água, durante 60 dias.

O nível de estresse (sem estresse; estresse moderado ou estresse severo) causado pela deficiência hídrica pode variar conforme a condução experimental de cada trabalho. Diversos fatores, como o tipo de solo, o tipo de cultivares, o tipo do vaso ou se foi conduzido no campo, bem como as características fenotípicas das

plantas de cada cultivar em relação a cada tratamento, atuam em conjunto para a determinação dos níveis de estresse.

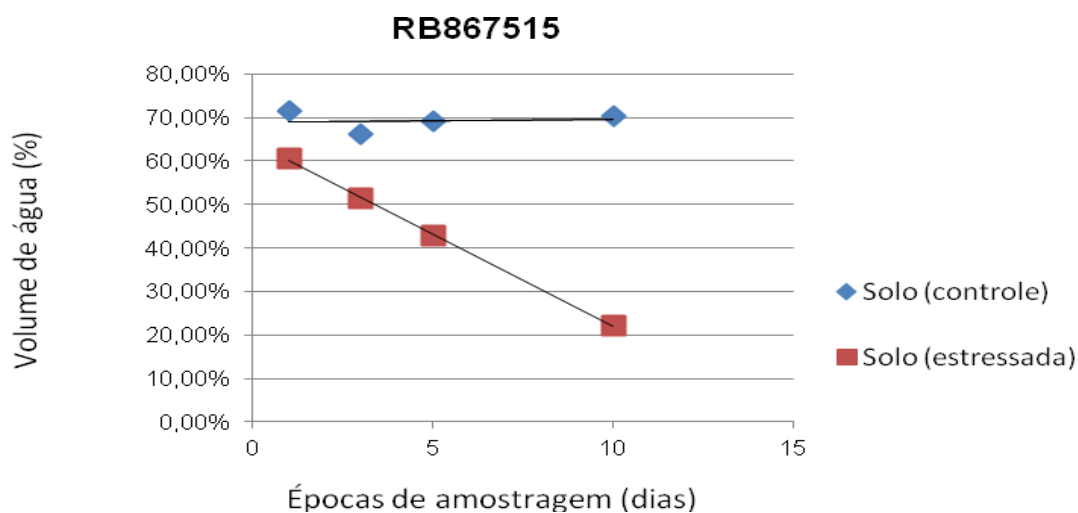


Figura 8. Volume de água presente nos poros do solo da cultivar RB867515 (tolerante).

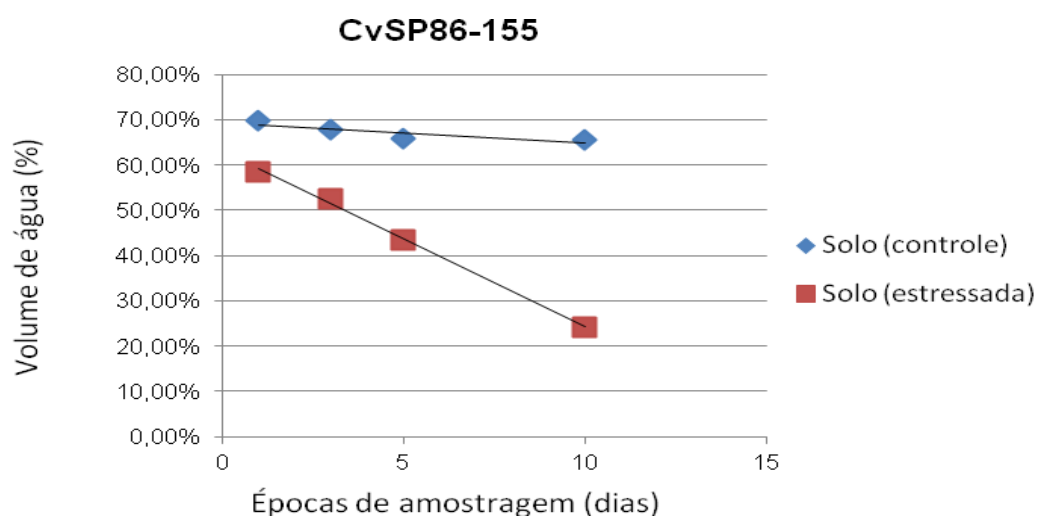


Figura 9. Volume de água presente nos poros do solo da cultivar SP86-155 (sensível).

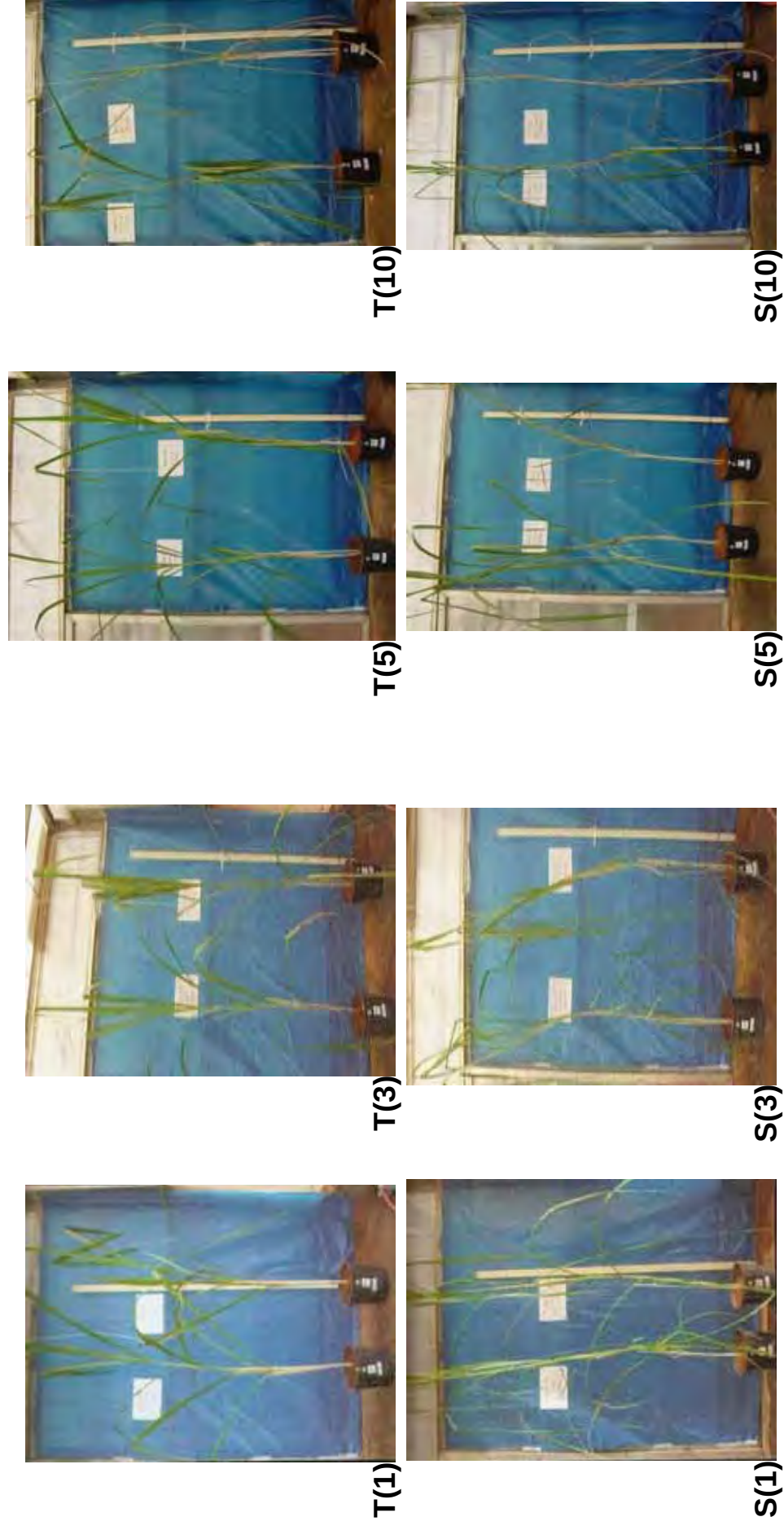


Figura 10. Fenótipo das cultivares RB867515 (T) e SP86-155 (S) sob déficit hídrico ao lado de suas respectivas plantas controles. Os diferentes aspectos fenotípicos podem ser visualizados nos diferentes dias de estresse hídrico: 1 dia (1), 3 dias (3), 5 dias (5) e 10 dias (10). Cada foto representa a planta sob déficit hídrico à direita e sua controle à esquerda.

5.3. Determinação do Teor de Prolina Livre

Com o objetivo de verificar a tolerância ao déficit hídrico nas raízes das cultivares de cana-de-açúcar RB867515 e SP86-155 sob deficiência hídrica nas quatro épocas de amostragem (1, 3, 5 e 10 dias), foi monitorado o acúmulo nos teores de prolina destas cultivares.

Na Tabela 7, podemos observar que não houve diferença significativa nos teores de prolina ($\mu\text{moles.g}^{-1}$) nas três primeiras épocas de amostragem (1, 3 e 5 dias) para as duas cultivares analisadas. Houve diferença significativa entre a última época de amostragem (10 dias) e as cultivares, sendo que a cultivar RB867515 apresentou maiores níveis de teores de prolina, com diferença de expressão de 25,43%.

Estes resultados foram similares aos encontrados por Gimenez (2011), que trabalhando com o palmito de cana-de-açúcar das cultivares SP83-5073, RB867515 e SP86-155 submetidas ao estresse hídrico, verificou que aos 10 dias de deficiência hídrica as mesmas apresentaram aumento significativo nos teores de prolina quando comparada com o 5º dia de tratamento. No entanto, Iskandar et al. (2011) trabalhando com colmos de cana-de-açúcar submetidas a estresse hídrico por 3, 7, 11 e 15 dias, identificaram que os níveis do teor de prolina aumentou após três dias de tratamento e continuou a aumentaram até os 15 dias.

Carlin (2009), estudando déficit hídrico e acidez no solo em cana-de-açúcar, avaliou que para o tratamento controle de acidez no solo, combinado a elevada deficiência hídrica (60 dias de estresse), houve aumento nos teores de prolina de 13,6%. Este resultado mostrou que o acúmulo deste aminoácido nas plantas está mais relacionado com a quantidade de água disponível no solo do que com a presença do íon tóxico. Várias condições de estresse como osmótico, salino e seca foram avaliados por Gzik (1996), onde detectou que o estresse osmótico e a seca resultaram num aumento acelerado do conteúdo de prolina. O estresse salino também induziu o acúmulo de prolina, sendo mais evidente no final do tratamento.

Tabela 7. Análise da determinação do teor de prolina livre das cultivares de cana-de-açúcar RB867515 e SP86-155 quando submetidas ao déficit hídrico nas épocas de amostragem (1, 3, 5 e 10 dias).

Tratamento	Cultivar	Época	Prolina ($\mu\text{moles g}^{-1}$) Planta/Controle ($\emptyset$)	Prolina ($\mu\text{moles g}^{-1}$) Planta/Estressada ($\emptyset$)	Diferença
1	RB867515	1	0,021	0,047	0,0267 c
2	SP86-155	1	0,019	0,021	0,0012 c
3	RB867515	3	0,010	0,035	0,0243 c
4	SP86-155	3	0,009	0,045	0,0357 c
5	RB867515	5	0,027	0,146	0,119 c
6	SP86-155	5	0,046	0,190	0,1433 c
7	RB867515	10	0,065	3,812	3,747 a
8	SP86-155	10	0,039	2,195	2,157 b
F(Cultivar)					1.65 ns
F(Época)					22.25*
F(Cultivar e Época)					1.69 ns
Época					
F (SP86-155)					5.85*
F (RB867515)					18.08*
Cultivar					
F (1)					0,00 ns
F (3)					0,00 ns
F (5)					0,00 ns
F (10)					6.71*

Letras diferentes indicam significância (médias de diferenças não iguais); ^{ns} Não significativo ($P>0,05$); * Significativo ($P\leq 0,05$);

Segundo Guimarães et al. (2008) a deficiência hídrica promovida por estresse biótico, ataque da cigarrinha em cana-de-açúcar, não resultou em acúmulo de prolina, sugerindo a existência de mecanismos distintos para a percepção do estresse hídrico promovido pela praga e pela variação no potencial osmótico nas células das raízes. Sendo assim, os teores de solutos compatíveis provavelmente não podem ser utilizados para quantificar o estresse promovido pela cigarrinha em cana-de-açúcar.

De modo geral, quando as plantas são expostas aos diversos tipos de estresse ambiental, dentre eles a seca, podem apresentar acúmulo de prolina. Este tipo de resposta tem sido relacionado à tolerância das plantas, podendo representar

um mecanismo regulador da perda de água, mediante o aumento da osmolaridade celular (FUMIS; PEDRAS, 2002). Santos, Lima e Morgado (2010) também afirmaram que o estresse hídrico provoca modificações na composição das células das plantas superiores, levando em muitos casos à produção e acúmulo de substâncias osmoticamente ativas. Premachandra et al. (1992), afirmaram que o ajuste osmótico tem por finalidade auxiliar a planta a manter o turgor, sustentando, dessa maneira, a alongação celular e expansão de regiões de crescimento com o desenvolvimento da deficiência hídrica.

Em nossos experimentos, os resultados do acúmulo de prolina na cultivar de cana-de-açúcar tolerante à seca junto às características fenotípicas previamente observadas mostram que este osmoprotetor pode ter auxiliado as plantas a manterem o seu turgor quando submetidas a 5 dias de deficiência hídrica (estresse moderado) e assim puderam suportar uma deficiência hídrica por um período maior, 10 dias de deficiência hídrica (estresse severo), quando comparado com a sensível.

5.4. Quantificação e integridade do RNA total de raízes de cana-de-açúcar

A técnica de cDNA-AFLP exige que o RNA total extraído de raízes de cana-de-açúcar seja de boa qualidade, para isso os mesmos foram quantificados e sua integridade verificada pelos métodos descritos abaixo. As Tabelas 8 e 9 mostram as quantificações das amostras de RNA total em um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), através da leitura de absorbância no comprimento de onda 260 nm, 280 nm e 230 nm. A relação das leituras 260/280 nm e 260/230 nm estima a quantidade de ácidos nucleicos. Podemos considerá-las como qualidade boa quando as leituras de 260/280 apresentam relações de 1,8 a 2,0 e 260/230 quando acima de 2,0. Relações fora destes valores indicam contaminantes na amostra com proteínas ou tiocianato de guanidina (SAMBROOK; FRITCH; MANIATS, 1989). Geralmente, a extração de RNA total pelo Kit *“Illustra RNAspin Mini RNA Isolation* (GE Healthcare) apresenta uma razão de 260/280 acima de 1,9, conforme descrito em seu protocolo.

Tabela 8. Quantificação em ng/ μ L do RNA total extraído da raízes das cultivares controles RB867515 (tolerante) e SP86-155 (sensível).

Cultivares	Épocas de amostragem	ng/ μ L	260/280	260/230
RB867515	1	235,06	2,04	2,39
SP86-155	1	289,92	2,07	2,00
RB867515	3	213,23	2,06	2,20
SP86-155	3	269,03	2,08	2,08
RB867515	5	697,49	2,02	2,22
SP86-155	5	554,63	2,08	2,47
RB867515	10	660,21	2,01	2,13
SP86-155	10	319,64	2,05	2,24

Tabela 9. Quantificação em ng/ μ L do RNA total extraído da raízes das cultivares estressadas RB867515 (tolerante) e SP86-155 (sensível).

Cultivares	Épocas de amostragem	ng/ μ L	260/280	260/230
RB867515	1	237,11	2,05	2,88
SP86-155	1	239,14	2,04	2,67
RB867515	3	314,81	2,05	2,76
SP86-155	3	251,20	2,05	2,65
RB867515	5	242,65	2,05	2,84
SP86-155	5	355,73	2,05	2,74
RB867515	10	285,58	2,06	2,54
SP86-155	10	375,76	2,06	2,34

A integridade do RNA total pode ser visualizada tanto na Figura 11 (gel de agarose 1,5%) como na Figura 12 (eletroferograma gerado pelo Agilent Bionalyzer). A boa visualização das bandas 28S e 18S nos dois métodos utilizados garantem a integridade do RNA total. Os resultados do número de integridade do RNA (RIN) de todas as amostras de RNA total apresentaram valores entre 7,4 a 9,2 (Figura 12). Amostras com um RIN abaixo de 6,0 indicam que o RNA total está parcialmente

degradado, já um RIN acima de 8,0 o mesmo encontra-se intacto (HUNICKE-SMITH, 2012).

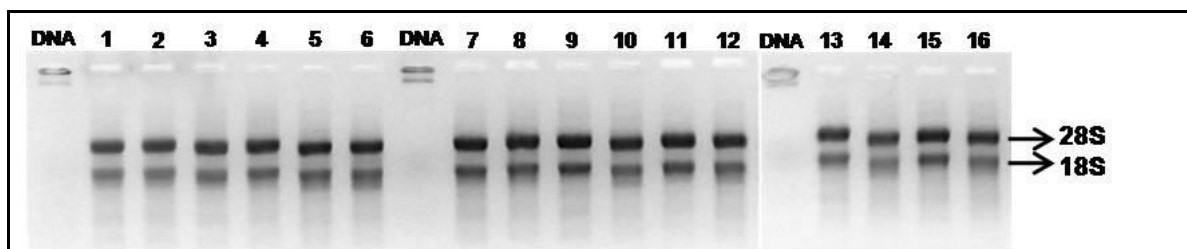


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,5% em condições desnaturantes. Nas colunas “DNA” foi aplicado 1 µg de DNA genômico de bactéria; estas colunas confirmam a eficiência e a pureza das extrações do RNA total de cada amostra. Já nas colunas numeradas de 1 a 16 foi aplicado 1,0 µg de RNA total extraído do *pool* de tecido radicular das quatro repetições de cada cultivar de cana-de-açúcar. As colunas 1-2; 5-6; 9-10 e 13-14; representam as amostras da cultivar RB867515 e cada par de números referem-se às amostras da planta controle e planta estressada, respectivamente. As colunas 3-4; 7-8; 11-12 e 15-16; representam as amostras da cultivar SP86-155 e cada par de números referem-se às amostras da planta controle e planta estressada, respectivamente. Colunas de 1 a 4 (1 dia de estresse); 5 a 8 (3 dias de estresse); 9 a 12 (5 dias de estresse) e 13 a 16 (10 dias de estresse).

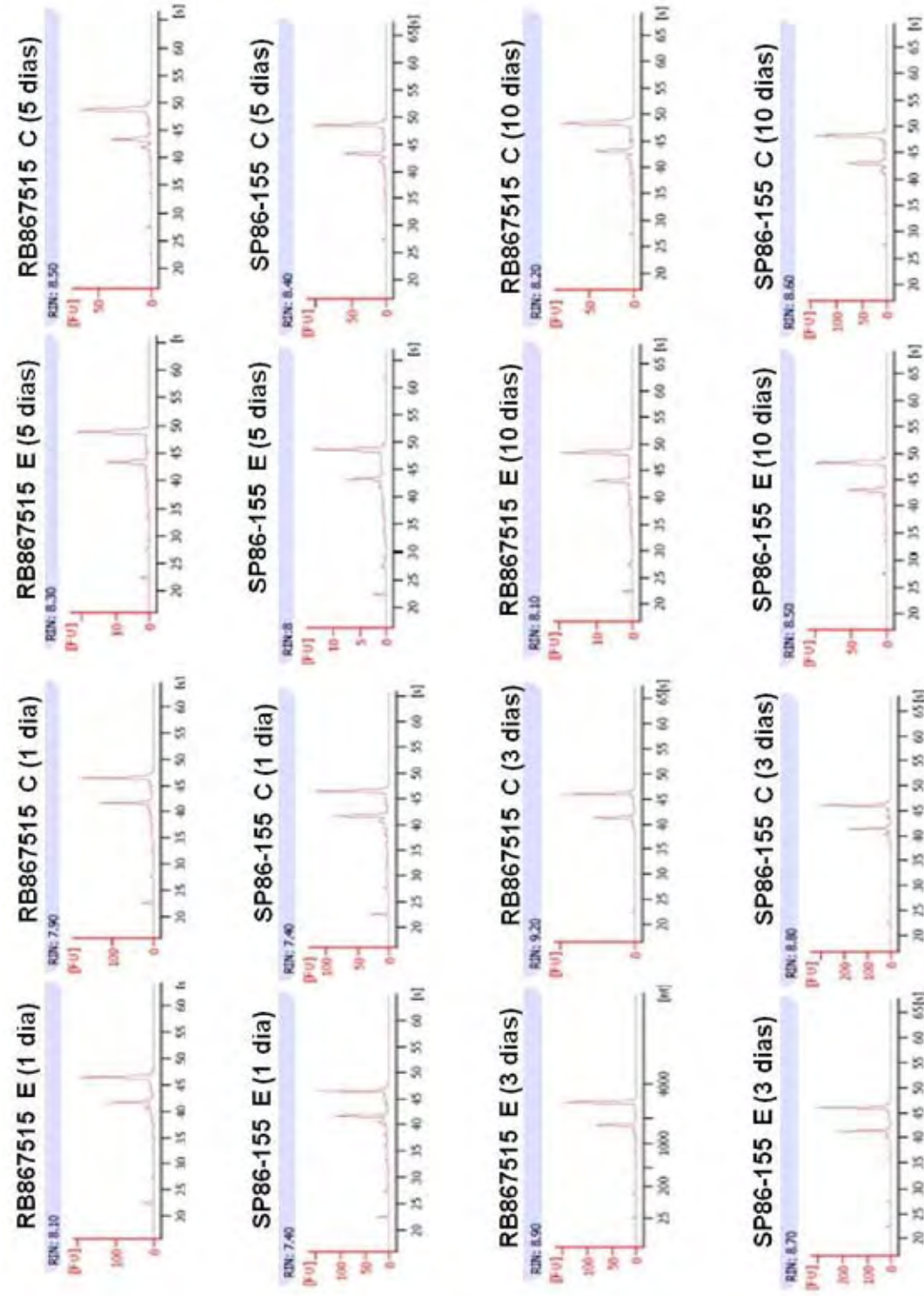


Figura 12. Imagem dos eletroferogramas de cada cultivar RB867515 e SP86-155, estressada (E) e controle (C), nas épocas de amostragem (1, 3, 5 e 10 dias), gerada a partir da imagem do gel, a qual foi criada pelo equipamento Agilent Bioanalyzer 2100

5.5. Quantificação do cDNA de raízes de cana-de-açúcar

Após a obtenção do RNA total de boa qualidade foi realizado a síntese dos cDNAs, cuja concentração e qualidade estão mostradas nas Tabelas 10 e 11. As relações 260/280 e 260/230 encontram-se dentro dos parâmetros descritos por Sambrook; Fritch; Maniats (1989). Estes cDNAs de boa qualidade foram em seguida utilizados na técnica de cDNA-AFLP. Diniz (2007) afirma que o grau de pureza do cDNA é determinante para a reprodutibilidade do AFLP, pois interfere na reação de restrição, que se for incompleta, gera fragmentos parcialmente digeridos, predominantemente de alto peso molecular, alterando o perfil de bandas resultantes.

Tabela 10. Quantificação em ng/ μ L do cDNA das cultivares controles RB867515 (tolerante) e SP86-155 (sensível).

Cultivares	Épocas de amostragem	ng/ μ L	260/280	260/230
RB867515	1	235,54	1,94	2,52
SP86-155	1	291,72	1,94	2,53
RB867515	3	304,27	1,93	2,50
SP86-155	3	261,04	1,91	2,55
RB867515	5	242,65	2,00	2,49
SP86-155	5	235,45	1,94	2,66
RB867515	10	272,35	1,93	2,52
SP86-155	10	278,06	1,89	2,50

Tabela 11. Quantificação em ng/ μ L do cDNA das cultivares estressadas RB867515 (tolerante) e SP86-155 (sensível).

Cultivares	Épocas de amostragem	ng/ μ L	260/280	260/230
RB867515	1	327,14	1,93	2,41
SP86-155	1	326,15	1,93	2,44
RB867515	3	347,82	1,89	2,58
SP86-155	3	354,82	2,10	2,40
RB867515	5	368,25	1,94	2,57
SP86-155	5	329,48	2,10	2,41
RB867515	10	360,29	1,92	2,54
SP86-155	10	290,91	2,04	2,54

5.6. Análise da técnica de cDNA-AFLP

No presente estudo, nove combinações de oligonucleotídeos seletivos *EcoRI/MseI* foram usados na análise de cDNA-AFLP entre cultivares de cana-de-açúcar tolerante e sensível ao déficit hídrico. O protocolo do *AFLP® Plant Mapping kit (Regular Plant Genomes)* da PE-Applied Biosystems, Inc., CA, USA (1997) permite 64 possíveis combinações de oligonucleotídeos, mas as nove escolhidas segundo este protocolo indicou boas combinações para monocotiledôneas.

As Figuras 13, 14 e 15 mostram todos os fragmentos expressos nas cultivares tolerante e sensível das plantas controles e estressadas. Foram identificados um total de 173 fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante estressada (FDE-CvTE), com tamanhos variando entre 80 a 1.000 pb.

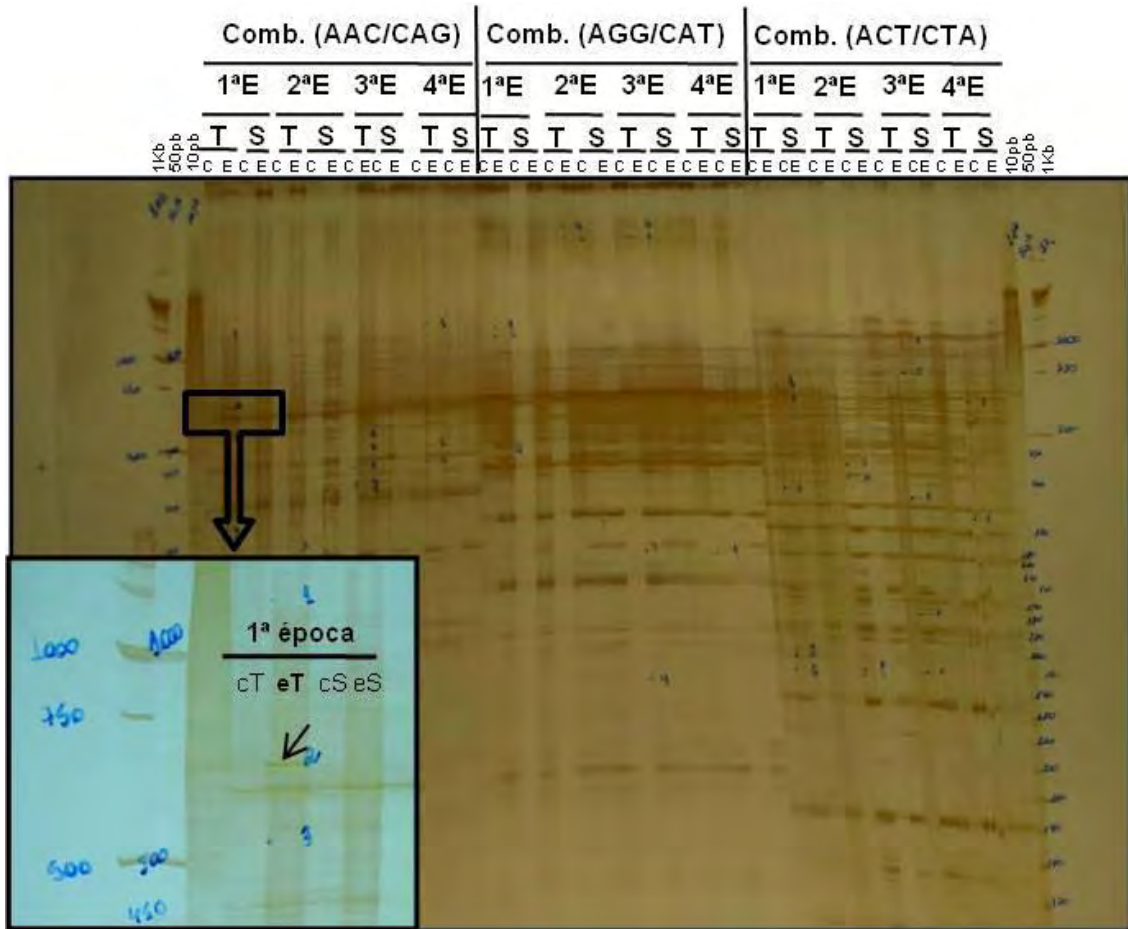


Figura 13. Fragmentos de expressão gênica de raízes de cana-de-açúcar das cultivares tolerante (T) e sensível (S), detectados por cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 6%. Nas 3 primeiras e últimas colunas, marcadores de peso molecular de 1 kb, 50 pb e 10 pb; as demais colunas mostram 3 combinações de oligonucleotídeos (AAC/CAG, AGG/CAT e ACT/CTA) nas 4 épocas de amostragem (E), com suas plantas tolerante e sensível, controle (C) e estressadas (E). No detalhe, a seta mostra o fragmento diferencialmente expresso (proteína dissulfeto isomerase) na cultivar tolerante sob déficit hídrico.

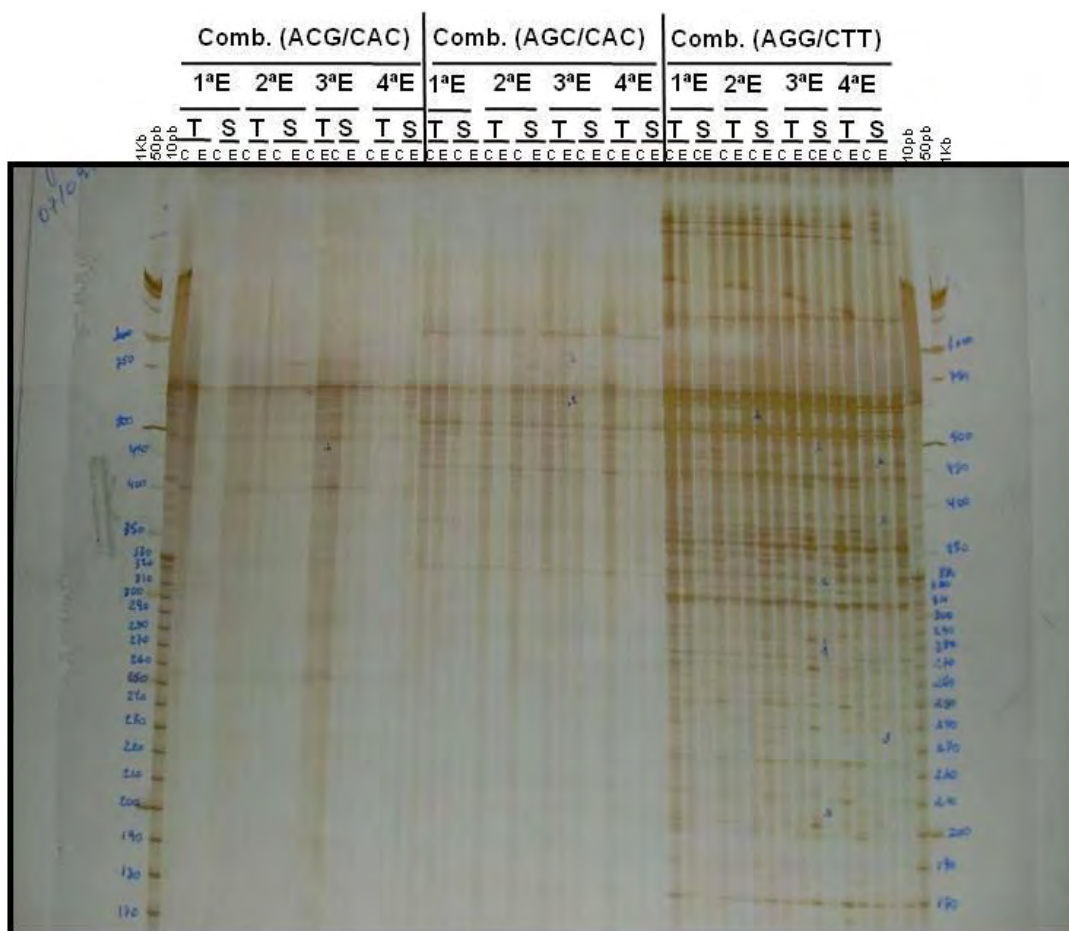


Figura 14. Fragmentos de expressão gênica de raízes de cana-de-açúcar das cultivares tolerante (T) e sensível (S), detectados por cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 6%. Nas 3 primeiras e últimas colunas (marcadores de peso molecular de 1 kb, 50 pb e 10 pb); as demais colunas mostram 3 combinações de oligonucleotídeos (ACG/CAC, AGC/CAC e AGG/CTT) nas 4 épocas de amostragem (E) com suas plantas tolerante e sensível, controle (C) e estressadas (E).

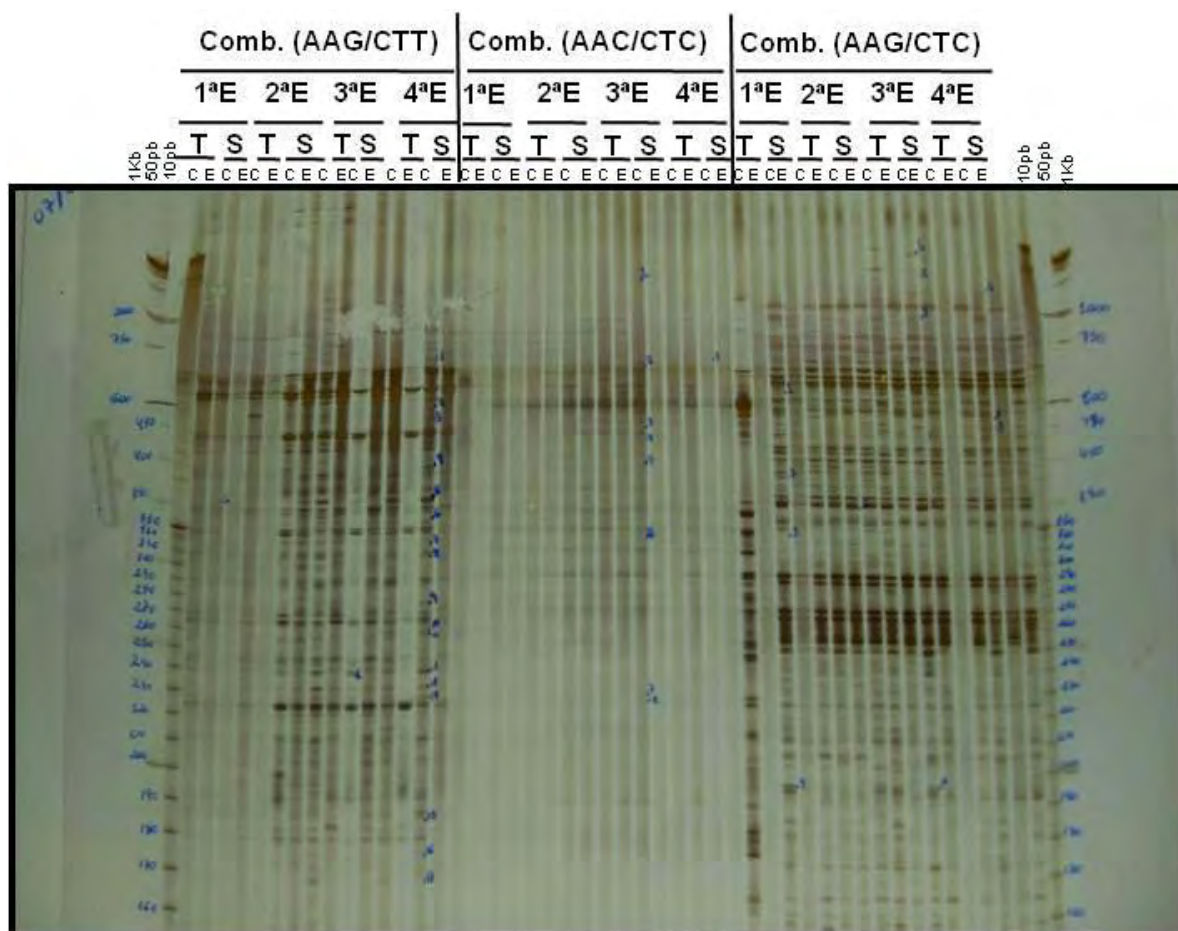


Figura 15. Fragmentos de expressão gênica de raízes de cana-de-açúcar das cultivares tolerante (T) e sensível (S), detectados por cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 6%. Nas 3 primeiras e últimas colunas (marcadores de peso molecular de 1 kb, 50 pb e 10 pb); as demais colunas mostram 3 combinações de oligonucleotídeos (AAG/CTT, AAC/CTC e AAG/CTC) nas 4 épocas de amostragem (E) com suas plantas tolerante e sensível, controle (C) e estressadas (E).

A terceira combinação de oligonucleotídeos (ACT/CTA) apresentou um maior número de fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante estressada (Tabela 12). Dos 173 FDE-CvTE, foi possível reamplificar e clonar 72; estes foram sequenciados e suas sequências foram analisadas pelo banco de dados público NCBI e SUCST (Tabela 13).

Sendo que, ao observar as três placas, verificou-se que a maioria das bandas expressas não mostrou nenhuma mudança significativa na intensidade de sinal entre o controle e os diferentes tratamentos, sugerindo que estes genes são expressos constitutivamente.

Tabela 12. Número de fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante (FDE CvTE) ao déficit hídrico, identificados por meio de cDNA-AFLP, com 9 combinações de oligonucleotídeos seletivos *EcoRI/MseI* nas 4 épocas de amostragem.

Combinação dos Oligonucleotídeos <i>EcoRI/MseI</i>	Épocas de amostragem	Nº FDE CvTE	Nº total de FDE CvTE
AAC/CAG	1	17	27
	2	1	
	3	6	
	4	3	
AGG/CAT	1	9	18
	2	2	
	3	4	
	4	3	
ACT/CTA	1	23	63
	2	30	
	3	8	
	4	2	
ACG/CAC	1	0	1
	2	0	
	3	1	
	4	0	
AGC/CAC	1	0	2
	2	0	
	3	2	
	4	0	
AGG/CTT	1	0	9
	2	1	
	3	5	
	4	3	
AAG/CTT	1	1	27
	2	1	
	3	1	
	4	24	
AAC/CTC	1	0	9
	2	0	
	3	8	
	4	1	
AAG/CTC	1	4	17
	2	1	
	3	9	
	4	3	

Tabela 13. Resultados das análises dos fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante estressada (FDE-CvTE) de cana-de-açúcar submetida ao déficit hídrico nas diferentes épocas de amostragem (EA). Os bancos de dados de nucleotídeos e proteínas da ferramenta NCBI-Blast utilizados nas análises datam maio 2012.

1ª Combinação de oligonucleotídeos (AAC/CAG)						
FDE-CvTE	Tamanho (bases)	EA	Nº acesso	Descrição no bando de dados	E-value	% identidade
1	647	1 ^a	gb IABP88739.1I	Protein disulfide isomerase (<i>Zea mays</i>)	8e-134***	193/207 (93%)
2	241	1 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	–
3	212	1 ^a	gb IEES03533.1I	Hypothetical protein SORBIDRAFT_03g033020 (<i>Sorghum bicolor</i>)	3e-80**	175/201 (87%)
4	122	1 ^a	gb ICA157782.1I	Saccharum hybrid cultivar SP80-3280	4e-12*	29/30 (97%)
5	96	1 ^a	gb IACG27294.1I	Absciscic stress ripening protein 2 [<i>Zea mays</i>]	3e-17**	86/114 (75%)
6	161	1 ^a	gb IACU57685.1I	RNA polymerase, sigma-24 subunit, ECF subfamily [<i>Chitinophaga pinensis</i>]	1e-18***	38/41 (93%)
7	267	1 ^a	gb IEED14083.1I	Aldose 1-epimerase, putative [<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500]	8e-46***	73/79(92%)
8	283	1 ^a	dbj IBAD02996.1I	Receptor-like serine/threonine kinase (RFK1) (<i>Oryza sativa</i> Japonica Group)	1e-27***	57/89 (64%)
9	193	1 ^a	gb IACG27294.1I	Absciscic stress ripening protein 2 [<i>Zea mays</i>]	1e-12**	75/78 (96%)
10	370	1 ^a	gb IEGK84894.1I	Amino acid adenylation domain protein [<i>Microcoleus vaginatus</i>]	2e-48***	108/115 (94%)
11	340	1 ^a	ref IXP_003568512.1I	Predicted: DUF21 domain-containing protein At4g14240-like isoform 2 (<i>Brachypodium distachyon</i>)	4e-13***	40/54 (74%)

Correspondente: SUCEST

Continuação						
12	175	1 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	–
13	169	1 ^a	gb ICD490789.1I	Wheat etiolated seedling shoot (<i>Triticum aestivum</i>)	8e-27*	SCAGSB1086C12.g
14	330	1 ^a	ref IXP_003568511.1I	Predicted: DUF21 domain-containing protein At4g14240-like isoform 1 (<i>Brachypodium distachyon</i>)	1e-14***	SCEZRT2020F03.g
15	330	3 ^a	ref IXP_003568511.1I	Predicted: DUF21 domain-containing protein At4g14240-like isoform 1 (<i>Brachypodium distachyon</i>)	1e-14***	SCEZRT2020F03.g
2 ^a Combinação de oligonucleotídeos (AGG/CAT)						
FDE-CvTE	Tamanho (bases)	EA	Nº acesso	Descrição no bando de dados	Evalue	% identidade Correspondente: SUCEST
16	370	1 ^a	gb IEES13838.1I	Hypothetical protein SORBIDRAFT_07g020490 (<i>Sorghum bicolor</i>)	8e-43***	SCSFFFL4019H06.g
17	595	1 ^a	gb IEES11462.1I	Hypothetical protein SORBIDRAFT_06g029180 (<i>Sorghum bicolor</i>)	5e-131***	SCMCCL6053G01.g
18	108	1 ^a	gb IEES00920.1I	Hypothetical protein SORBIDRAFT_03g025420 (<i>Sorghum bicolor</i>)	1e-108**	SCBFFFL5073D08.g
19	437	1 ^a	gb IEES06359.1I	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g005115 (<i>Sorghum bicolor</i>)	1e-66**	SCCCCL3002E01.b
20	595	1 ^a	gb IEES11462.1I	Hypothetical protein SORBIDRAFT_06g029180 (<i>Sorghum bicolor</i>)	6e-130***	SCMCCL6053G01.g
21	329	3 ^a	gb IADY41524.1I	Serine/threonine-protein kinase akt-1 (<i>Ascaris suum</i>)	6e-14***	SCBGRT3074F12.g
22	87	4 ^a	gb IEER92313.1I	Hypothetical protein SORBIDRAFT_01g036280 (<i>Sorghum bicolor</i>)	8e-28**	SCCCT3009A12.g
23	327	4 ^a	gb IACK58678.1I	NBS-LRR disease resistance protein (<i>Setaria italica</i>)	1e-33***	–

Continuação						
24	329	4 ^a	gb IADY41524.1I	Serine/threonine-protein kinase akt-1 (<i>Ascaris suum</i>)	6e-14***	37/53 (70%) –
3^a Combinação de oligonucleotídeos (ACT/CTA)						
FDE-CvTE	Tamanho (bases)	EA	Nº acesso	Descrição no bando de dados	Evalue	% identidade
25	99	1 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	–
26	145	1 ^a	gb IEES00737.1I	Hypothetical protein SORBIDRAFT_03g014455 (<i>Sorghum bicolor</i>)	9e-11***	30/40 (75%) –
27	99	1 ^a	gb IACG32415.1I	Glutathione peroxidase 4 (<i>Zea mays</i>)	7e-08***	23/26 (88%) SVCPR3086B05.g
28	110	1 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	–
29	141	1 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	–
30	191	1 ^a	gb IAAQ15289.1I	Aspartic protease (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	2e-18***	39/54 (72%) SCRFRZ3055F01.g
31	102	1 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	–
32	171	1 ^a	gb IAAQ39316.1I	Cytochrome P450 cyp98a1 (<i>Sorghum bicolor</i>)	1e-41**	74/75 (99%) SCSBAD1051D01.g
33	221	1 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	–
34	225	1 ^a	gb IACA30301.1I	Putative senescence-associated protein (<i>Cupressus sempervirens</i>)	4e-12***	27/30 (90%) SCSFHR1044F05.g
35	234	1 ^a	gb IACY95275.1I	unknown (<i>Zea mays</i>)	3e-39**	70/75 (93%) SCSFLV1048H03.g
36	179	1 ^a	gb IEES91872.1I	Hypothetical protein SORBIDRAFT_01g028020 (<i>Sorghum bicolor</i>)	3e-13***	35/46 (76%) SCEQAM2036A08.g

Continuação						
37	221	1 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	–
38	157	1 ^a	gb IACJ62211.1I	maize proteinase inhibitor (<i>Zea mays</i> subsp. <i>Parviglumis</i>)	3e-15**	SCEQRT2093A12.g
39	240	1 ^a	gb IABV48741.1I	Heat shock protein cognate 70 (<i>Bombus terrestris</i>)	8e-37***	SCBGSB1025D06.g
40	245	1 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	–
41	131	1 ^a	gb IEES04098.1I	Hypothetical protein SORBIDRAFT_03g043690 (<i>Sorghum bicolor</i>)	3e-11***	SCCCFL8001A09.g
42	157	2 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	SCCCRT3006D09.g
43	191	2 ^a	gb IAAQ15289.1I	Aspartic protease (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	2e-18***	SCRFRZ3055F01.g
44	178	2 ^a	gb IEER91872.1I	Hypothetical protein SORBIDRAFT_01g028020 (<i>Sorghum bicolor</i>)	2e-12***	SCEQAM2036A08.g
45	141	2 ^a	gb IAAQ39316.1I	Cytochrome P450 cyp98a1 (<i>Sorghum bicolor</i>)	1e-41**	SCSBAD1051D01.g
46	438	2 ^a	ref IXP_003578837.1I	Predicted: probable alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase 7-like (<i>Brachypodium distachyon</i>)	7e-80***	SCCCAM2001C04.g
47	190	2 ^a	gb IAES97338.1I	cytochrome P450 likeTBP (<i>Medicago truncatula</i>)	3e-11***	SCBGFL4054F07.g
48	157	2 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	–
49	191	2 ^a	gb IAAQ15289.1I	Aspartis protease (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	2e-18***	SCRFRZ3055F01.g
50	290	2 ^a	gb IEER95454.1I	Hypothetical protein SORBIDRAFT_01g046250 (<i>Sorghum bicolor</i>)	5e-93**	SCJFRZ2005A02.g
51	132	2 ^a	dbj IBAD82399.1I	bHLH transcription factor (<i>Oryza sativa</i> Japonica Group)	2e-09***	SCCCFL8001A09.G

Continuação						
52	172	2 ^a	gb IAAQ39316.1I	Cytochrome p450 cyp98A1 (<i>Sorghum bicolor</i>)	1e-41**	74/75 (99%) SCSBAD1051D01.g
53	99	2 ^a	gb IACG32415.1I	Glutathione peroxidase 4 (<i>Zea mays</i>)	5e-114**	161/170 (95%) SCVPRT3086B05.g
54	245	2 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	–
55	147	2 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	–
56	299	2 ^a	dbj IBAB33421.1I	Putative senescence-associated protein (<i>Pisum sativum</i>)	3e-24***	SCRUAD1063A11.g
57	352	2 ^a	gb IACN33277.1I	UDP-glucuronic acid decarboxylase 1 (<i>Zea mays</i>)	5e-69***	SCBFAD1090E09.g
58	249	2 ^a	gb IABR25756.1I	myb related protein hv1 (<i>Oryza sativa</i> Indica Group)	2e-90**	SCRUFL1118H10.g
59	249	2 ^a	gb IAAQ12638.1I	heat shock 70kD protein (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>)	3e-30***	56/78 (72%) –
60	138	2 ^a	gb IEER99956.1I	Hypothetical protein SORBIDRAFT_02g043750 (<i>Sorghum bicolor</i>)	2e-10***	31/41 (76%) –
61	250	2 ^a	dbj IBAB33421.1I	putative senescence-associated protein (<i>Pisum sativum</i>)	2e-20***	SCSFST3075A06.g
62	191	2 ^a	gb IAAQ15289.1I	Aspartis protease (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	4e-18***	SCRFRZ3055F01.g
63	298	2 ^a	dbj IBAB33421.1I	putative senescence-associated protein (<i>Pisum sativum</i>)	2e-26***	SCSFH1044F05.g
64	171	2 ^a	gb IACG25686.1I	Cytochrome p450 cyp98a1(<i>Sorghum bicolor</i>)	1e-41**	74/75 (99%) SCSBAD1051D01.g
65	249	2 ^a	–	Nenhuma similaridade significativa encontrada	–	–
66	249	2 ^a	gb IACF24477.1I	70 kDa heat shock protein (<i>Thaumatomonas</i> sp. TMT002)	2e-28***	57/77 (74%) –

Continuação						
67	249	2 ^a	gb IACG36955.1	deoxyribodipyrimidine photolyase (<i>Zea mays</i>)	2e-31***	54/57 (96%) –
68	99	3 ^a	gb IACG32415.1	Glutathione peroxidase 4 (<i>Zea mays</i>)	5e-114**	161/170 (95%) SCVPRT3086B05.g
69	389	3 ^a	gb IEES19163.1	Hypothetical protein SORBIDRAFT_09g005800 (<i>Sorghum bicolor</i>)	4e-79***	118/121 (98%) –
70	191	3 ^a	gb IAAQ15289.1	Aspartis protease (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	2e-18***	39/54 (72%) SCRFRZ3055F01.g
71	352	3 ^a	gb IACN33277.1	UDP-glucuronic acid decarboxylase 1 (<i>Zea mays</i>)	5e-67***	104/109 (95%) SCBFAD1090E09.g
72	298	3 ^a	dbj IBAB33421.1	putative senescence-associated protein (<i>Pisum sativum</i>)	2e-25***	58/90 (64%) SCSFH1044F05.g

E-value : Valor estatístico de probabilidade de erro da similaridade encontrada nos resultados apresentados pela utilização da ferramenta NCBI-BLAST (ALTSCHUL et al., 1990); Foram aceitáveis e-value acima de -08; *** Alinhamento usando a ferramenta (BLASTX);** Alinhamento usando a ferramenta (BLASTX) com um correspondente do SUCEST e * Alinhamento usando a ferramenta (TBALSTX)

Os fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante estressada identificados nas análises de bioinformática foram categorizados segundo o banco de dados público UniprotKB (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>) e organizados em 13 categorias (Figura 16). As categorias funcionais mais representadas foram: proteínas hipotéticas conservadas (FDE-CvTE 3, 16, 17, 18, 19, 22, 26, 36, 41, 44, 50, 60 e 69) com 18%, resposta ao estresse (FDE-CvTE 1, 5, 8, 9, 23, 27, 38, 39, 47, 53, 59, 66, 67 e 68) com 19% e proteínas não classificadas (FDE-CvTE 2, 4, 12, 13, 25, 28, 29, 31, 33, 37, 40, 42, 48, 54, 55 e 65) com 22%. As demais categorias funcionais, metabolismo de carboidratos (FDE-CvTE 7), metabolismo de proteínas (FDE-CvTE 10), hipotéticas (FDE-CvTE 20 e 35), dinâmica celular (FDE-CvTE 21 e 24), dinâmica e regulação (FDE-CvTE 11, 14 e 15), comunicação e transdução de sinal (FDE-CvTE 6, 51 e 58), bioenergética (FDE-CvTE 46, 57 e 71), metabolismo secundário (FDE-CvTE 32, 45, 52 e 64), metabolismo de lipídeos (FDE-CvTE 30, 43, 49, 62 e 70) e a de crescimento e desenvolvimento (FDE-CvTE 34, 56, 61, 63 e 72), apresentaram valores de representatividade variando de 1 a 7%.

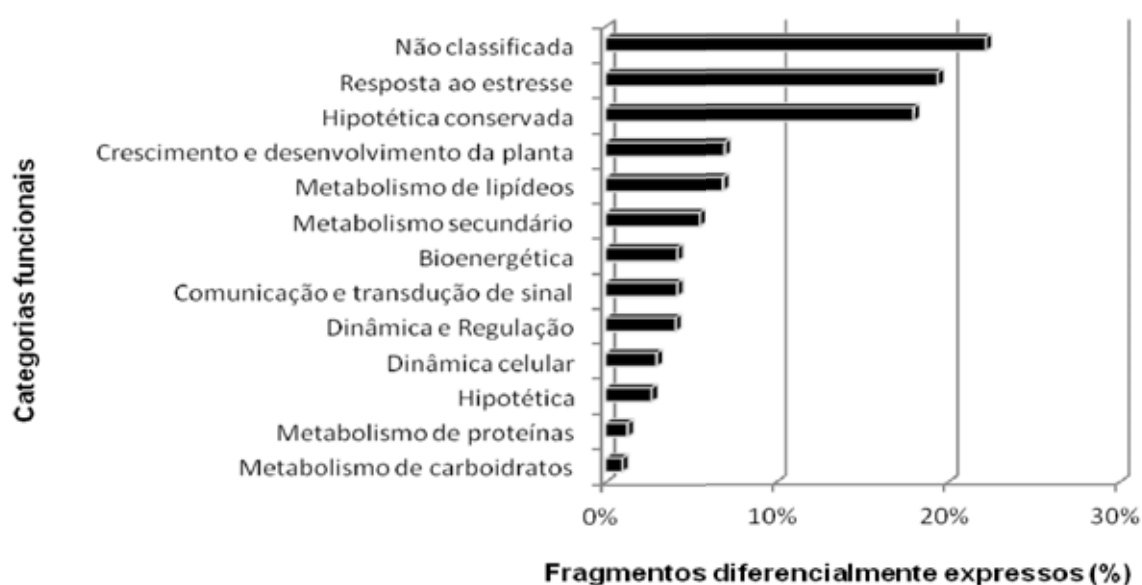


Figura 16. Categorização funcional dos fragmentos diferencialmente expressos em raízes da cultivar tolerante (FDE-CvTE) de cana-de-açúcar submetida ao déficit hídrico, segundo UniProtKB. Os FDE-CvTE foram distribuídos em 13 grupos de categorias e representados em porcentagem.

5.7 Fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante estressada (FDE-CvTE) categorizados como envolvidos em resposta ao estresse

As plantas estão constantemente expostas a vários estresses ambientais, como estresses bióticos (ataque de pragas, bactérias, fungos entre outros) e abióticos (mudanças climáticas, seca, sanilidade, radiação solar, pH do solo, etc). Em busca de sua sobrevivência ou do aprimoramento evolutivo, elas podem responder geneticamente, ativando ou reprimindo genes, podem tolerar o estresse até certo limite ou se apresentarem sensíveis a estes diversos fatores ambientais.

Sendo assim, Graça (2009) afirma que plantas submetidas à condição de deficiência hídrica apresentam alterações que podem prevenir e tolerar a perda de água. Nestas alterações, o sistema radicular é a primeira região da planta a detectar e sinalizar às demais células, tecidos e órgãos os efeitos do estresse. A emissão de sinais químicos pelas raízes é responsável também por modificações no comportamento estomático durante a deficiência hídrica (TAIZ; ZEIGER, 2004; SAUTER; DAVIES; HARTUNG, 2001).

Dentre estes sinais, o gene que codifica a proteína dissulfeto isomerase (PDI), codificada por 513 aminoácidos, foi expresso em raízes de cana-de-açúcar da cultivar RB867515 (tolerante) sob estresse hídrico na primeira época de amostragem (1ªEA) (Tabela 13).

Nossos resultados estão de acordo com (WANG, WANG; LI, 2012), que afirmaram que plantas de milho sob condições de déficit hídrico também expressaram a PDI. Além disso, os mesmos afirmaram que esta proteína é induzida por outros estresses abióticos (salino, ABA e frio) e sua elevada expressão pode contribuir na tolerância ao estresse abiótico em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*. Segundo Ray et al. (2003), a PDI foi rapidamente induzida em plantas de trigo tratado com fungo. Sendo assim, ela é expressa tanto por estresse abiótico quanto por estresse biótico. No projeto SUCEST, Borges, Peroto e Ramos (2010) também identificaram esta mesma proteína em cana-de-açúcar, sob estresses abióticos e bióticos.

A proteína dissulfeto isomerase é uma das proteínas mais conhecidas que se localiza no retículo endoplasmático (KOCH, 1985). As células parecem ter uma

estratégia para superar o estresse do retículo endoplasmático (ER) através do aumento da atividade do enovelamento de proteínas, a degradação das proteínas não enoveladas e a regulação de apoptose, Kamauchi et al. (2005). Além da função isomerase, estas proteínas podem apresentar atividade relacionada a uma chaperona (GILBERT, 1997). Chaperonas são proteínas que participam no enovelamento de outras proteínas (ELLIS; HARTL, 1996). Algumas proteínas, ao serem sintetizadas, necessitam do auxílio de chaperonas moleculares para seu correto enovelamento (BORGES; PEROTO; RAMOS, 2010).

A proteína dissulfeto isomerase possui regiões de *tiorredoxina* (TRX). As regiões de TRX são muito importantes nas sequências destas proteínas. Segundo Nakamura, Nakamura e Yodoi (1997), a atividade de redução/oxidação (redox) celular regula várias funções celulares. O estresse oxidativo pode promover respostas positivas, como a ativação ou a proliferação celular, bem como respostas negativas como a inibição do crescimento ou a morte celular. Assim, o estado redox celular é mantido por uma molécula intracelular reguladora, a TRX. A tiorredoxina (TRX) contém um sítio ativo conservado Cys-Gly-Pro-Cys, seu peso molecular é de 12 KDa, possui envolvimento na defesa antioxidante, redução de peroxidases e fatores de transcrição (RAHLFS et al., 2002).

Provavelmente, a rápida indução desta proteína (PDI) na primeira época de amostragem, na cultivar RB867515, favoreceu seu caráter de tolerância à seca. Como já mencionado, a PDI pode estar relacionada com a função de chaperona, e neste contexto, ela pode ter participado do correto enovelamento das proteínas sintetizadas nas células das raízes de cana-de-açúcar em resposta ao estresse hídrico.

Outro grupo de genes que codificam proteínas bem conhecidas, cuja atividade também se relaciona com uma chaperona (SARKAR; KUNDNANI; GROVER, 2012), são as proteínas de choque térmico – HSP (*Heat Shock Proteins*). Estes genes foram expressos na cultivar tolerante na 1ª e 2ª EA (Tabela 13).

Ambrosone et al. (2012), trabalhando com déficit hídrico em culturas de células de batata identificou pela técnica de cDNA-AFLP uma alta expressão de dois membros da família de proteínas HSP. Borges, Peroto e Ramos (2010) realizaram um estudo em cana-de-açúcar a fim de identificar e anotar chaperonas e proteínas

relacionadas ao estresse. Do total das anotações de EST, aproximadamente 44% pertenceu à família Hsp70 e suas co-chaperonas. Em outro estudo, Huerta; Freire e Cardemil (2013) avaliaram que o gene HSP70 teve uma alta expressão em *Aloe vera* submetidas a estresse térmico a 40-45°C e 50% de deficiência hídrica. Os autores Meyer e Da Silva (1999) e Sarkar, Kundnani e Grover (2012) afirmam que as HSPs são uma classe de proteínas altamente conservadas, possuindo grande valor evolutivo. Além disso, a família HSP-70 é a mais conservada filogeneticamente entre os sistemas vivos, compreendendo desde as bactérias, plantas e animais, sendo ligadas ao processo geral de enovelamento de proteínas nas células.

Meyer e Da Silva (1999) afirmaram ainda que as células que sintetizam as HSPs ficam protegidas contra novas exposições ao estresse, o que se reflete em menores lesões também no organismo ou em partes dele. Feige e Polla (1994) afirmam que em condições não estressantes, as proteínas de choque térmico também são expressas, sendo conhecidas como HSC (*Heat Shock Cognates*). Estas são expressas normalmente nos organismos não submetidos às condições de estresse, Fuller, Issels e Slosman (1994). Em plantas, as HSC estão localizadas em organelas e compartimentos citosólicos das células da maioria dos tecidos (ANDERSON et al., 1994).

Observamos em nossos experimentos, uma rápida e acelerada indução (revelada no RT-qPCR) da chaperona HSP70. Este resultado sugere que esta proteína também esteja favorecendo o caráter de tolerância à seca da cultivar RRB867515 quando comparada à sensível sob o estresse hídrico.

O déficit hídrico neste experimento também induziu na cultivar tolerante, a expressão de um gene que codifica uma proteína correlacionada com o ácido abscísico, ASR2 (*ABA, Stress, and Ripening 2*), na 1ª EA (Tabela 13).

O ácido abscísico (ABA) provoca uma variedade de processos nas plantas: crescimento da raiz, produção de pólen viável, maturação do fruto, resposta da planta aos danos causados por estresses abióticos e bióticos (CREELMAN; MULLET, 1997). Davies e Mansfield (1983) também afirmam que este hormônio vegetal está envolvido em vários processos fisiológicos e de desenvolvimento da planta, dentre eles: respostas dos tecidos vegetativos ao estresse osmótico e amadurecimento de frutas. As proteínas ASR são moléculas pequenas com

hidrofilicidade forte, possuem níveis elevados de His, Glu, e Lys (ÇAKIR et al., 2003).

Sales et al. (2012), trabalhando com cana-de-açúcar sob condições de estresses radiculares (deficiência hídrica e baixa temperatura) verificaram que a deficiência hídrica afetou o *status* hídrico da planta, causando diminuição no potencial hídrico, sugerindo uma sinalização hidráulica que levou ao fechamento estomático. Como consequência da diminuição da quantidade de água nas folhas, aumentaria indiretamente a concentração de ABA presente na parte aérea próximo às células-guarda, o que também poderia reduzir a abertura estomática. Já, Kalifa et al. (2004), trabalhando com estresse hídrico e salino em tomates, encontraram a proteína ASR1 tanto no núcleo quanto no citosol das células das folhas. Em milho submetido à seca, foi detectado no xilema um aumento na concentração de ABA (BAHRUN et al., 2002).

Os resultados obtidos sugerem que quando ocorreu a diminuição no volume de água presente nos poros do solo, com 1 dia de estresse hídrico, houve o aumento na expressão do ácido abscísico na cultivar tolerante quando comparada à sensível. Este aumento da expressão do ABA pode ter auxiliado as plantas da cultivar tolerante a fecharem seus estômatos nas primeiras épocas de amostragem como também na ativação de outros mecanismos de resposta ao estresse, suportando um período maior do déficit hídrico (5 dias).

Em nossos resultados também foi possível avaliar a expressão aumentada do gene que codifica a enzima glutathione peroxidase 4 (GPX-4) nas três primeiras épocas de amostragem (1^a, 2^a e 3^a) (Tabela 13), um indício de que as plantas da cultivar tolerante estavam sob estresse oxidativo.

Em um estudo com 20 cultivares comerciais canavieiras submetidas ao estresse hídrico por 3, 10 e 20 dias, identificou-se pela técnica SuperSAGE a expressão de vários genes relacionados com a categoria de estresses abióticos. Destes, o gene que codifica a enzima glutathione peroxidase foi altamente expresso em cultivares tolerantes quando comparadas com as controles (KIDO et al., 2012). Carmona et al. (2004) detectaram a indução da enzima glutathione peroxidase, pela técnica de cDNA-AFLP, durante a interação entre cana-de-açúcar e o fungo *Puccinia melanocephala*, estresse biótico. Em raízes de *Arabidopsis* sob estresse por

alumínio, houve a expressão de várias peroxidases após uma hora de estresse (KUMARI; TAYLOR; DEYHOLAS, 2008).

A exposição das plantas a diversas condições ambientais pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo moléculas únicas de oxigênio (O_2), radicais superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($OH^\cdot$). Para se protegerem contra todos estes intermediários tóxicos, as plantas ativam o sistema de defesa que inclui várias enzimas, dentre elas a glutathione peroxidase (GPX), que cataliza a eliminação das ROS (DEDEMO et al., 2013; ROXAS et al., 2000). Existem quatro GPXs (GPX-1, GPX-2, GPX-3 e a GPX-4) conhecidas que contêm seleno cisteína no sítio ativo (ARTHUR, 2000). A enzima GPX-4, segundo Ursini et al. (1999), está claramente associada com a sua capacidade de metabolizar hidroperóxidos de fosfolipídios. Brigelius-Flohé (1999) verificou que a glutathione peroxidase, a qual metaboliza hidroperóxidos de fosfolipídios (PHGPx), é uma enzima antioxidante universal por proteger lipídeos da membrana.

A expressão da enzima GPX-4 nas três primeiras épocas de amostragem (1, 3 e 5 dias de déficit hídrico), foi um indício de que as plantas da cultivar tolerante estavam realmente sob um estresse oxidativo. A ativação da GPX-4 na cultivar tolerante (RB867515), provavelmente atuou na eliminação das ROS como também na proteção dos lipídeos das membranas das células das raízes de cana-de-açúcar, as quais possivelmente estavam com o sistema radicular em degradação, devido ao estresse causado pelo déficit hídrico.

Também detectamos a expressão do gene que codifica uma proteína inibidora de protease, na 1ª EA (Tabela 13).

O aumento da expressão do gene da proteína inibidora de protease em milho (MPI) está associado a infecções ocasionadas por fungos. O ferimento na planta causado pelo patógeno seria o indutor da expressão desta proteína. Em geral, ferimentos, tratamento com ácido abscísico ou jasmonato de metila estimulam a acumulação desta expressão gênica (CORDERO; RAVENTÓS; SEGUND, 1994).

As plantas respondem ao ataque de insetos pela indução e o acúmulo de um conjunto grande de proteínas de defesa. Medeiros (2008) realizou uma investigação sobre as modificações transcricionais que ocorrem em plantas de cana-de-açúcar,

em resposta ao ataque de lagartas de *Diatraea saccharalis*. A indução de transcritos de *sugarwin* (*sugarcane wound-inducible*) ocorreu em resposta ao ferimento mecânico, dano provocado por *D. saccharalis* e tratamento com metil jasmonato. Além disso, sua expressão foi restrita ao local de dano. Sugarwins fazem parte do grupo de genes induzidos tardiamente por dano como parte da estratégia de defesa de cana-de-açúcar. Sendo assim, o acúmulo do gene *mpi* em folhas de milho também está relacionado com o processo de danificação mecânica (TAMAYO et al., 2000).

Em nossos resultados, a expressão do gene que codifica a proteína MPI na cultivar tolerante de cana-de-açúcar pode estar relacionada com uma danificação no sistema radicular da planta. Os pêlos radiculares ou tricomas se rompem quando desidratados, podendo assim induzir proteínas inibidoras de proteases.

Além destas proteínas já citadas acima foram detectados também como resposta da planta ao estresse: um receptor que pode estar envolvido na sinalização de resposta de defesa da planta, *Receptor-like serine/threonine kinase* (RS/TKs), bem no início do estresse hídrico (1ª EA) (Tabela 13) e um gene que codifica uma proteína de resistência de plantas a doenças (*NBS-LRR disease resistance protein*) na 4ª EA (10 dias de deficiência hídrica) (Tabela 13).

No genoma de *Arabidopsis* existe um grande grupo de receptores serina/treonina quinases, mais conhecidos por *receptor-like kinases* (RLKs) (SHIU; BLEECKER 2001; SHIU et al., 2004). Os RLKs estão envolvidos em muitas respostas ambientais e no próprio desenvolvimento da planta (AFZAL; WOOD; LIGHTFOOT, 2008). Chae et al. (2009), trabalhando com *Arabidopsis* sob alguns tratamentos de estresse abiótico, biótico e hormonal afirmam que as RLKs estão envolvidas em vários processos de sinalização em plantas.

Os receptores serina/treonina quinases detectados em raízes de cana-de-açúcar tolerante submetida ao déficit hídrico, podem estar atuando em conjunto com uma cascata de sinalização e ativação de genes em resposta ao caráter de tolerância à seca.

Entretanto, neste estudo, o gene que codifica essa proteína de resistência que contém uma série de repetições ricas em leucina (LRRs), um sítio de ligação de nucleotídeos (NBS) e um provável domínio de sinalização amino-terminal. São

denominadas proteínas NBS-LRR. Geralmente, as proteínas de vegetais (LRRs) são determinantes da resposta de hipersensibilidade (HR), as quais podem provocar a morte celular em defesa da planta. Carmona et al. (2004) identificou a expressão de proteínas NBS-LRR em cana-de-açúcar sob estresse biótico. Gupta et al. (2010), em estudo com cana-de-açúcar sob estresse hídrico, também identificou a expressão de proteínas com domínios ricos em repetições em leucina (LRRs).

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, sugerimos que as proteínas NBS-LRR estejam auxiliando no caráter de tolerância das plantas das cultivares RB867515, em resposta ao déficit hídrico.

5.8. Fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante estressada (FDE-CvTE) categorizados como proteínas hipotéticas conservadas

Nosso experimento de déficit hídrico em raízes de cana-de-açúcar tolerantes ao déficit hídrico evidenciou a expressão de muitos genes codificadores de proteínas categorizadas como hipotéticas conservadas. Estas tiveram similaridade com proteínas hipotéticas SORBIDRAFT: Sb03g033020; Sb07g020490; Sb06g029180 (resposta a ozônio); Sb03g025420; Sb04g005115 (um domínio com repetições ricas em leucina; possui atividade de proteína quinase); Sb01g036280; Sb03g014455; Sb01g028020 (localiza-se no retículo endoplasmático e na membrana plasmática); Sb03g043690 (um domínio bHLH); Sb01g046250 (desenvolvimento de flores, folhas; regulação da transcrição; resposta a vírus e morfogênese de tricomas); Sb02g043750 (domínio *zinc-finger*), e Sb09g005800 (participa na via e regulação das citocininas; possui dois componentes do sistema de transdução de sinal); tiveram algumas funções definidas segundo o banco de dados público UniprotKB.

O domínio bHLH está relacionado a ligação de fatores de transcrição, os quais são proteínas que controlam muitos processos celulares por regularem a expressão de genes alvo. A função deles é ativar ou reprimir a transcrição do gene controlado pelo promotor. O fator de transcrição bHLH 155 pode regular o desenvolvimento da raiz (UniProtKB). Além disso, o domínio bHLH pode estar envolvido na resposta à deficiência de ferro em raízes de *Arabidopsis* (LONG et al.,

2010). Gonzalez et al. (2008) afirmam que em *Arabidopsis* a via de biossíntese de antocianinas é regulada pelos fatores transcricionais TTG1/bHLH/Myb. Domínios com genes codificando proteínas da família das proteínas com dedos de zinco (“*Zinc finger*”) também são importantes classes de fatores de transcrição para muitos genes em eucariotos.

Esta proteína apresentou-se induzida na variedade de cana-de-açúcar tolerante SP80-0185 interagindo com *Leifsonia* (FERRO et al., 2007). Gupta et al. (2010) também identificou proteínas com domínio *Zinc finger* em estudo com cana-de-açúcar sob estresse hídrico.

Estes domínios ou fatores de transcrição previamente citados, são muito importantes por estarem envolvidos em muitas respostas de plantas aos estresses bióticos e abióticos. Neste trabalho, os fatores de transcrição detectados possivelmente estão ativando muitos genes relacionados aos mecanismos de resposta ao déficit hídrico em cana-de-açúcar. Além disso, a expressão de genes codificadores de proteínas categorizadas como hipotéticas conservadas, torna-os candidatos a estudos mais investigativos a respeito de suas funções, por estarem respondendo ao estresse hídrico em cana-de-açúcar.

5.9. Fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante estressada (FDE-CvTE) categorizados como proteínas não classificadas

Dezesseis fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante estressada (FDE-CvTE) não apresentaram similaridade significativa com os bancos de dados público NCBI e SUCEST. Dedemo (2011), trabalhando também com a técnica de cDNA-AFLP, identificou nas cultivares tolerantes estressadas (SP83-5073 e RB867515) nove fragmentos diferencialmente expressos sem nenhuma similaridade com as sequências dos bancos de dados pesquisadas. É muito provável que estes dezesseis FDE-CvTE sejam genes ainda não conhecidos que podem estar envolvidos na tolerância ao déficit hídrico em cana-de-açúcar. Um estudo mais aprofundado destes genes poderá auxiliar no conhecimento prévio adquirido dos mecanismos moleculares de tolerância de plantas e futuras pesquisas

para o desenvolvimento de novas variedades mais eficientes quanto a utilização da água ou tolerantes ao déficit hídrico.

5.10 Validação dos resultados da técnica de cDNA-AFLP pela técnica de PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

A boa qualidade e integridade do RNA total (RIN entre 7,4 a 9,2) e cDNA permitiu dar início na técnica de RT-qPCR (dados das amostras de cDNA não mostrados). A titulação dos oligonucleotídeos tanto para os genes de referência (endógenos) quanto para os genes alvo (interesse) mostrou-se eficiente para algumas concentrações. O programa gerou gráficos das curvas de dissociação (*Melt curve*) para todas as concentrações analisadas. A partir destes resultados, foi possível determinar através de um único pico (*Melt curve*) as melhores concentrações de oligonucleotídeos (Figura 17).

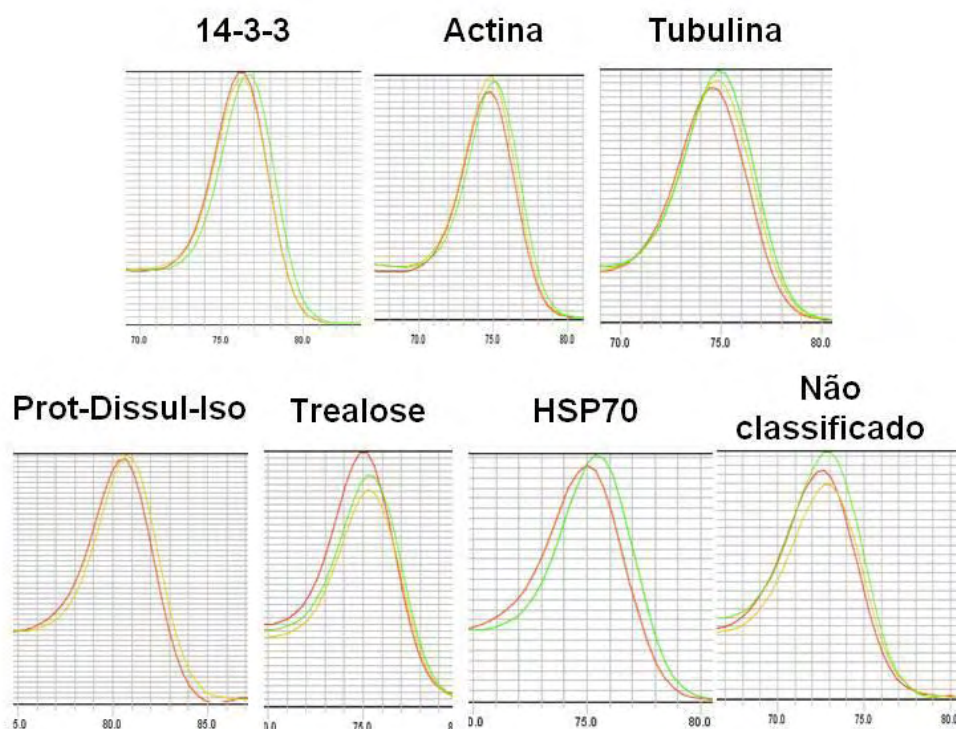


Figura 17. Validação dos oligonucleotídeos através do padrão de dissociação obtido após RT-qPCR. Amplificação dos cDNAs de um *pool* de cDNA das plantas controles das duas cultivares analisadas para os genes 14-3-3, Actina, Tubulina, Prot. Dissul. Iso., Trealose, HSP70 e Não classificado. Cada gene apresentou um único pico após curva de dissociação confirmando a especificidade de cada oligonucleotídeo.

Esta curva (*Melt curve*) é necessária para a certificação da especificidade do oligonucleotídeo à molécula alvo e identificação de possíveis contaminações na reação, já que o SYBR Green liga-se inespecificamente a qualquer molécula de DNA de fita dupla (APPLIED BIOSYSTEMS, 2012). A Tabela 14 mostra as concentrações de oligonucleotídeos escolhidas.

Tabela 14. Melhores concentrações de oligonucleotídeos dos genes de referência (14-3-3, Actina e Tubulina) e dos genes alvos (Proteína dissulfeto isomerase, Trealose, HSP70 e Não classificado).

Titulação dos Genes:	Melhores concentrações de oligonucleotídeos F/R (nM)
Gene de referência 14-3-3	300/600
Gene de referência Actina	300/600
Gene de referência β -Tubulina	600/600
Gene alvo Proteína Dissulfeto Isomerase	600/300
Gene alvo Trealose	300/300
Gene alvo HSP70	600/600
Gene alvo Não classificado	100/300

Após, a eficiência de amplificação de cada gene foi realizada por meio de uma curva de diluição em série no mesmo equipamento, o qual gerou Figuras para cada gene nas amostras controle das duas cultivares (RB867515 e SP86-155). Todos os genes analisados se apresentaram eficientes com valores de R^2 igual a 0,99 e EFF%: entre 90 e 110%. Sendo assim, a concentração de 100 ng mostrou-se com melhores resultados para todos os genes estudados (Figuras 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24).

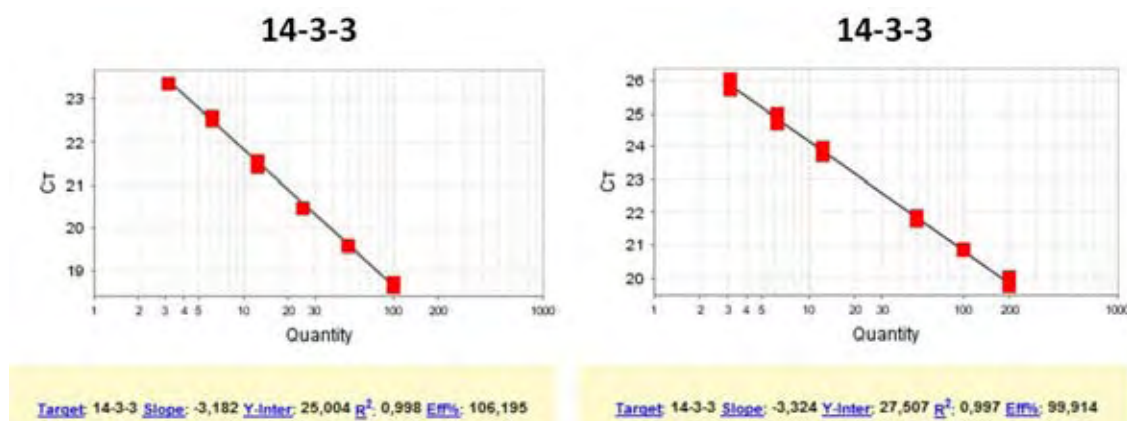


Figura 18. Curva de diluição do gene de referência 14-3-3, nas plantas controles das cultivares tolerante e sensível, respectivamente.

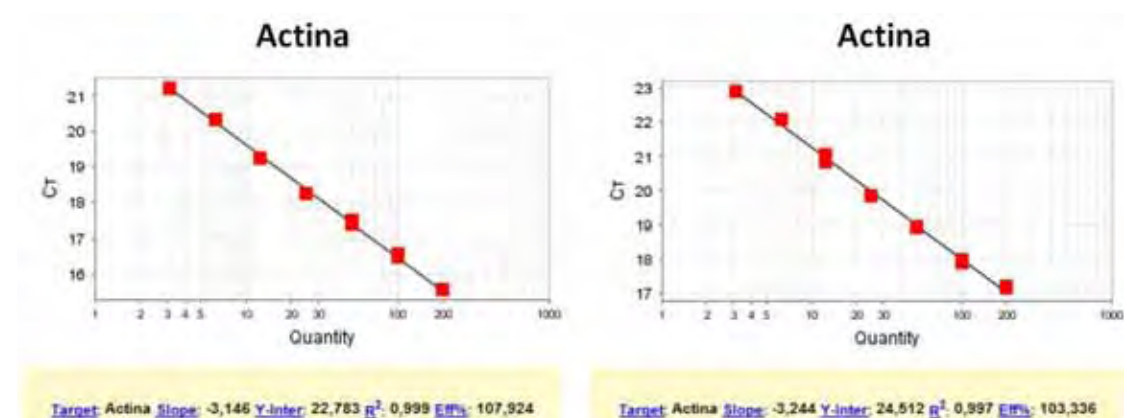


Figura 19. Curva de diluição do gene de referência Actina, nas plantas controles das cultivares tolerante e sensível, respectivamente.

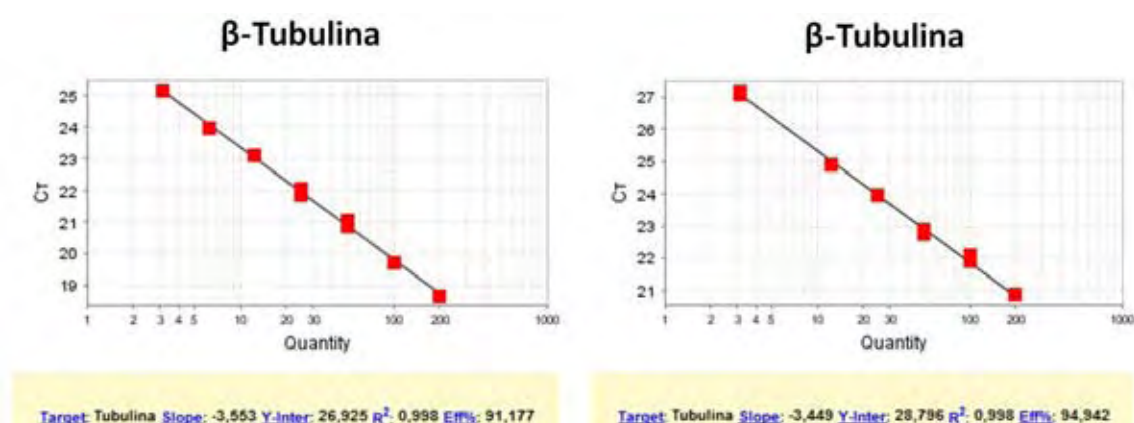


Figura 20. Curva de diluição do gene de referência Tubulina, nas plantas controles das cultivares tolerante e sensível, respectivamente.

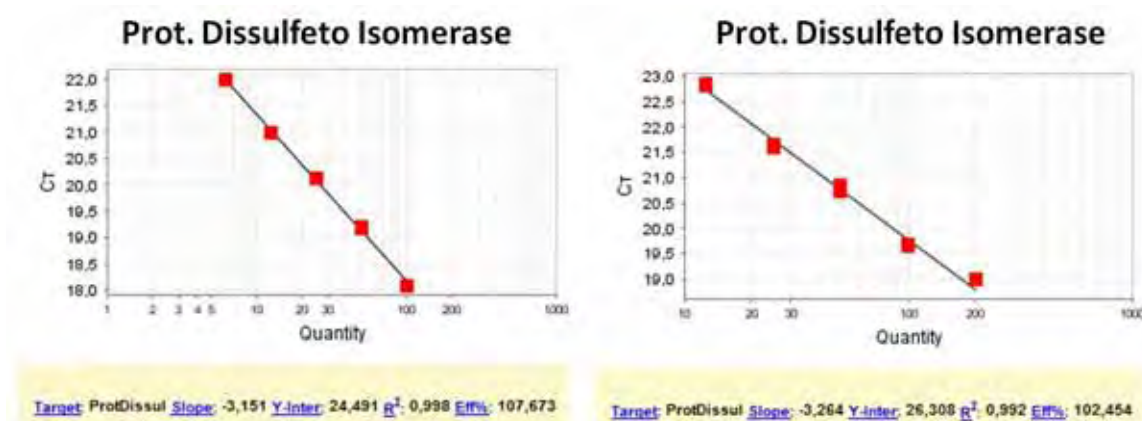


Figura 21. Curva de diluição do gene de referência Proteína dissulfeto isomerase, nas plantas controles das cultivares tolerante e sensível, respectivamente.

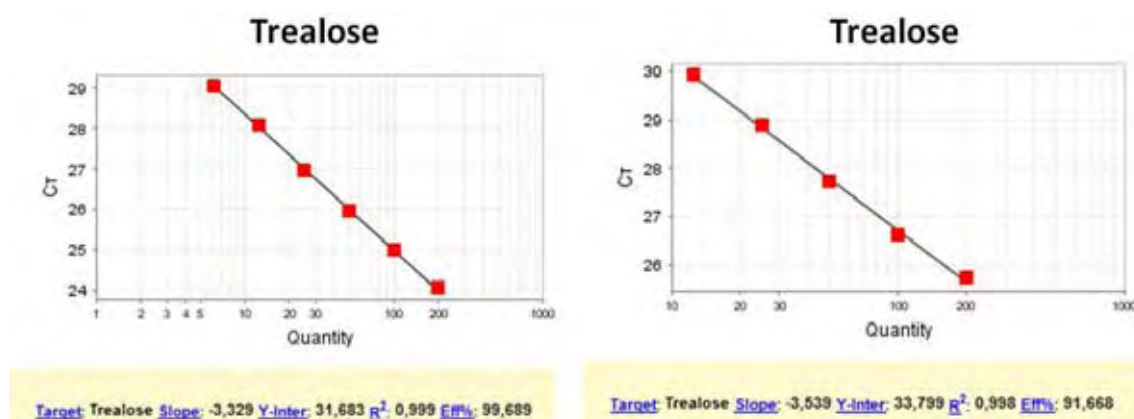


Figura 22. Curva de diluição do gene de referência Trealose, nas plantas controles das cultivares tolerante e sensível, respectivamente.

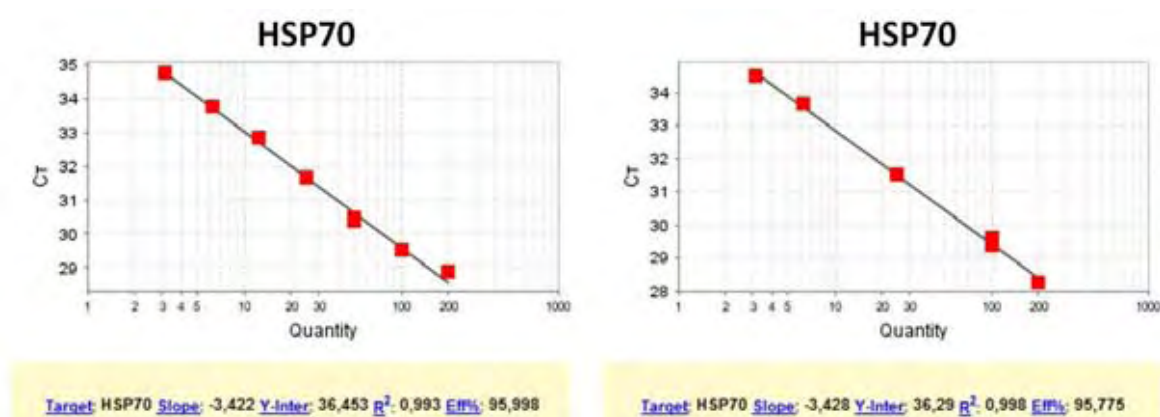


Figura 23. Curva de diluição do gene de referência HSP70, nas plantas controles das cultivares tolerante e sensível, respectivamente.

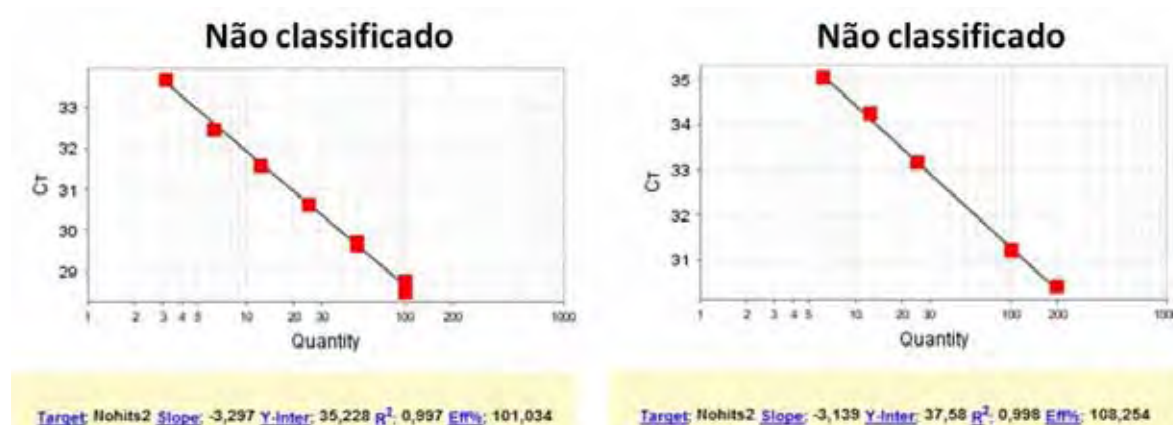


Figura 24. Curva de diluição do gene de referência Não classificado (No hits 2), nas plantas controles das cultivares tolerante e sensível, respectivamente.

A normalização dos genes de referência e os Cts de todos os genes analisados foram realizados no programa Expression Suite Software v1.01 (*Applied Biosystems, Foster, CA, USA*). Na normalização, os genes 14-3-3, Actina e Tubulina apresentaram um número de *Score* baixo: 0,739, 0,849 e 0,874, respectivamente. Quanto menor este número (*Score*) ou pontuação, mais estável é a expressão dos genes de referência comparado a expressão dos genes alvo (VANDESOMPELE et al., 2002).

Além destes resultados, uma segunda normalização foi realizada pelo programa NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTTOFT, 2004), o qual gerou para cada gene 14-3-3, Actina e Tubulina valores de estabilidade 0,376; 0,180 e 0,436, respectivamente. Como o valor de estabilidade da Actina dado por este programa foi o mais baixo comparado com os outros dois endógenos, este foi indicado como o melhor endógeno.

Os resultados originados pela RT-qPCR confirmam os resultados obtidos pela técnica de cDNA-AFLP. A expressão do gene que codifica a Proteína dissulfeto isomerase (PDI) na cultivar tolerante (RB867515) sob deficiência hídrica mostrou-se rapidamente induzida e com uma maior expressão na 1ª EA, resultado também encontrado pela técnica de cDNA-AFLP. A partir da 2ª EA (3, 5 e 10 dias de deficiência hídrica) houve uma diminuição da expressão deste gene, sendo que na última EA, o mesmo foi reprimido. Comparando a cultivar sensível (SP86-155) com a tolerante, a expressão deste gene foi menor na 1ª EA, semelhante à 2ª EA com

diminuições de expressão nas duas últimas EA, embora a expressão do gene PDI nas duas últimas EA tenha sido superior ao da tolerante (Figura 25).

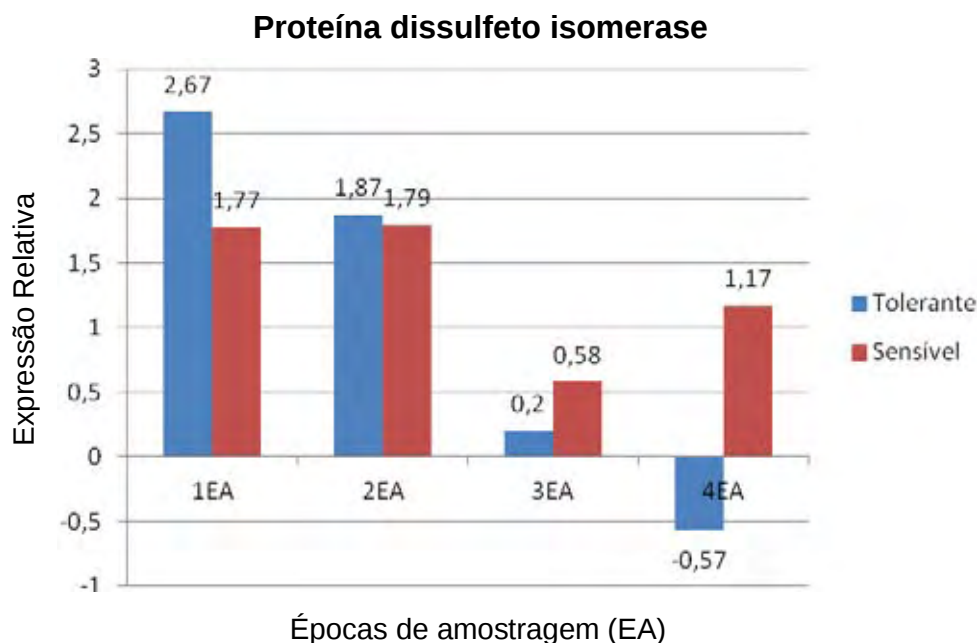


Figura 25. Expressão relativa do gene alvo que codifica a Proteína dissulfeto isomerase avaliado por RT-qPCR utilizando amostras de tecido radicular de duas cultivares RB867515 (tolerante) e SP86-155 (sensível) sob déficit hídrico, nas quatro épocas de amostragem (1, 3, 5 e 10 dias).

Já o gene Trealose na cultivar tolerante apresentou uma indução gênica muito alta, mantendo-se estável ao longo do tratamento, na técnica de cDNA-AFLP este FDE-CvTE foi detectado nas duas primeiras EA . Contudo, a expressão deste gene para a cultivar sensível foi mais baixa com posterior redução da expressão na 3ª e 4ª EA (Figura 26).

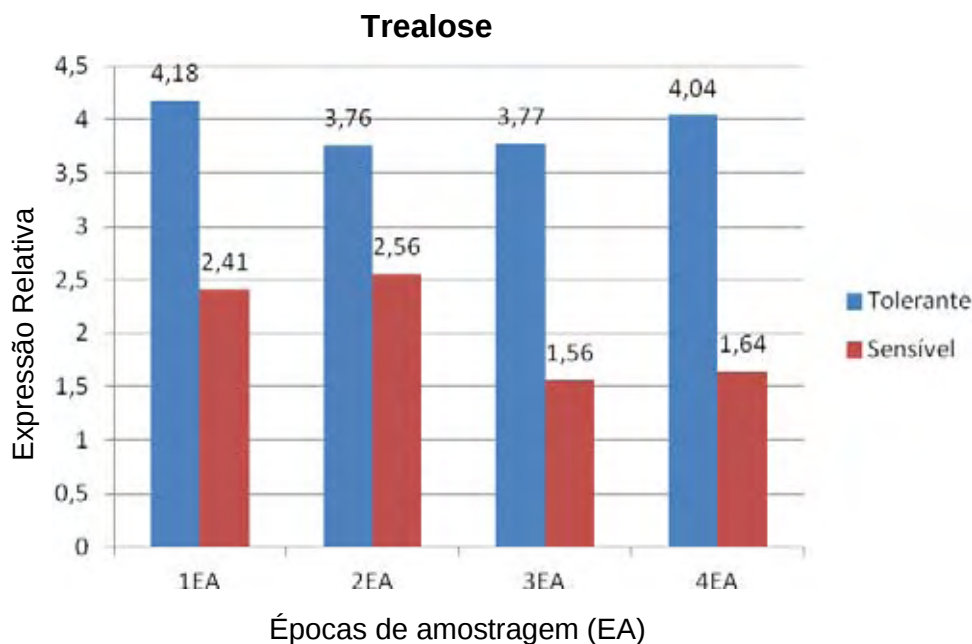


Figura 26. Expressão relativa do gene alvo Trealose avaliado por RT-qPCR utilizando amostras de tecido radicular de duas cultivares RB867515 (tolerante) e SP86-155 (sensível) sob déficit hídrico, nas quatro épocas de amostragem (1, 3, 5 e 10 dias).

Para o gene HSP70 na cultivar tolerante foi possível analisar uma expressão gênica crescente conforme as épocas de amostragem. A 4^a EA se destacou com um pico máximo de expressão, enquanto que na cultivar sensível a expressão deste gene se iniciou lentamente, tendo um pico máximo na 3^a EA. Nesta época, a expressão do gene foi aproximadamente a mesma para as duas cultivares analisadas. Em seguida, na 4^a EA a expressão deste gene foi bem reduzida (Figura 27). Através da técnica de cDNA-AFLP, foi possível identificar este gene tanto na 1^a EA quanto na 2^aEA.

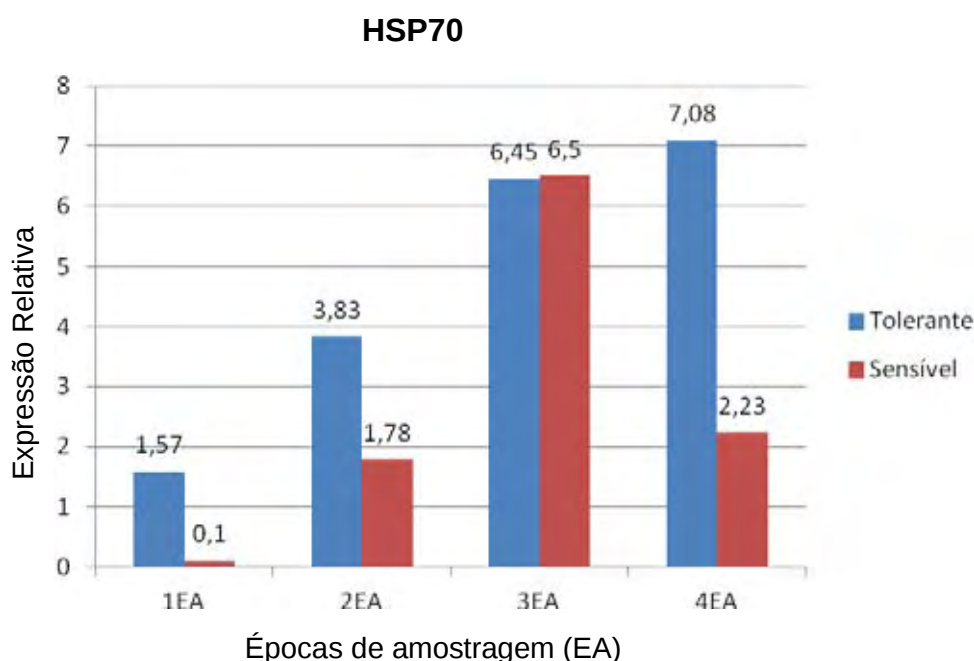


Figura 27. Expressão relativa do gene alvo HSP70 avaliado por RT-qPCR utilizando amostras de tecido radicular de duas cultivares RB867515 (tolerante) e SP86-155 (sensível) sob déficit hídrico, nas quatro épocas de amostragem (1, 3, 5 e 10 dias).

Contudo, o gene não classificado foi reprimido inicialmente (1^a EA) para ambas as cultivares analisadas. Após a 2^a EA o gene não classificado passou a ser mais expresso na cultivar tolerante, tendo um pico máximo na 4^a EA quando comparado a cultivar sensível (Figura 28). O mesmo FDE-CvTE foi identificado na 2^a EA na técnica de cDNA-AFLP.

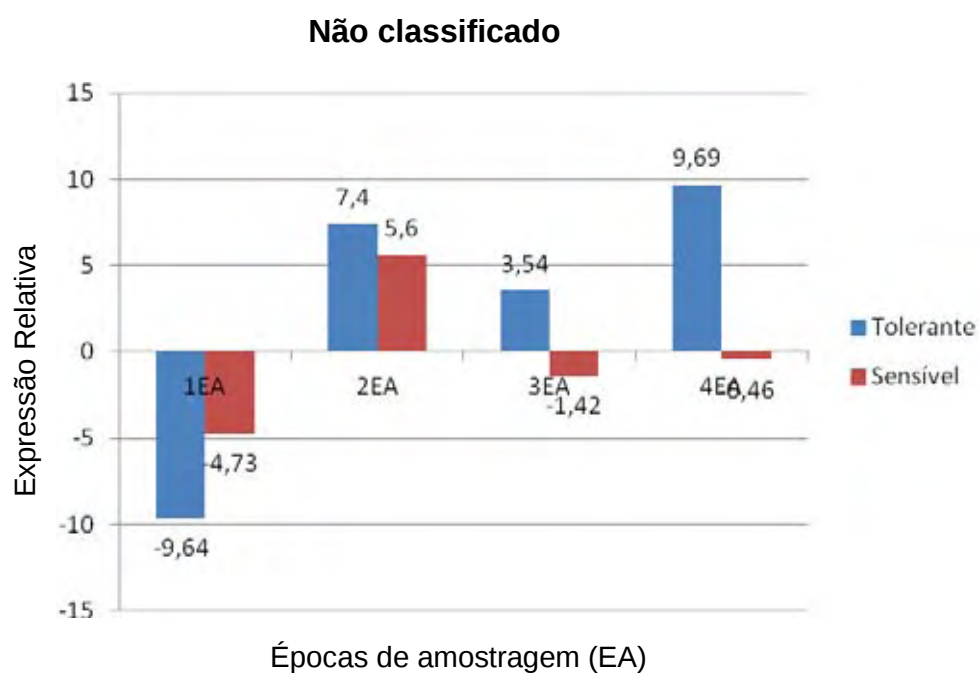


Figura 28. Expressão relativa do gene Não classificado avaliado por RT-qPCR utilizando amostras de tecido radicular de duas cultivares RB867515 (tolerante) e SP86-155 (sensível) sob déficit hídrico, nas quatro épocas de amostragem (1, 3, 5 e 10 dias).

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

A maior expressão dos níveis de prolina na cultivar tolerante (RB867515) quando comparada à sensível (SP86-155) aos 10 dias de déficit hídrico pode comprovar seu caráter de tolerância à seca.

A análise comparativa entre genótipos de cana-de-açúcar tolerante (RB867515) e sensível à seca (SP86-155) por meio da técnica de cDNA-AFLP foi capaz de identificar 173 fragmentos diferencialmente expressos na cultivar tolerante estressada.

Os fragmentos diferencialmente expressos pela cultivar tolerante fornecem sequências candidatas que poderão ser posteriormente testadas para verificar a relação com o caráter de tolerância à seca em cana-de-açúcar.

Os genes que não foram classificados (No hits) provavelmente são muito importantes por estarem envolvidos no entendimento dos mecanismos moleculares de tolerância de plantas e no desenvolvimento de novas variedades mais tolerantes à deficiência hídrica.

A técnica de RT-qPCR validou os resultados obtidos pelo cDNA-AFLP, mostrando uma consistência e confiabilidade dos dados de expressão de ambas as técnicas.

A cultivar SP86-155, provavelmente é sensível ao déficit hídrico por apresentar um atraso na expressão dos níveis de prolina, trealose, bem como nos genes chaperonas (proteína dissulfeto isomerase e HSP70).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZAL, A. J.; WOOD, A. J.; LIGHTFOOT, D. A. Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases: Roles in Signaling and Plant Defense. **American Phytopathological Society**, Review, v. 21, n. 5, 2008.

AGRICULTURA EM FOCO - **Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*)**. Disponível em: < <http://agriculturainfoco.blogspot.com.br/search/label/Cana-de-açúcar>>. Acesso em: 26 fevereiro 2012.

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

AMBROSONE, A.; DI GIACOMO, M.; LEONE, A.; GRILLO, M. S.; COSTA, A. Identification of early induced genes upon water deficit in potato cell cultures by cDNA-AFLP. **Journal Plant Research**, Regular paper, 10p. 2012.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, p. 5245-5250, 2004.

ANDERSON, J. V.; LI, Q. B.; HASKELL D. W.; GUY C. L. Structural Organization of the Spinach Endoplasmic Reticulum-Luminal 70-Kilodalton Heat-Shock Cognate Gene and Expression of 70-Kilodalton Heat-Shock Genes during Cold Acclimation. **Plant Physiology**, V. 104, n. 4, p. 1359-1370, 1994.

ANDRADE, L. A. de B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2006. cap.1, p. 25-67.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Manuals & Protocols**. Disponível em: <<http://www.lifetechnologies.com/global/en/website-overview/ab-welcome.html>>. Acesso em: 28 fev. 2012.

ARTHUR, J. R. The glutathione peroxidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 1825-1835, 2000.

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.

AZEVEDO, R. A.; CARVALHO, R. C.; CIA, M. C.; GRATÃO, P.L. Sugarcane Under Pressure: An Overview of Biochemical and Physiological Studies of Abiotic Stress. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 42-51, 2011.

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

BACHEM, C. W. B.; OOMEN, R. F. J.; VISSER, R. G. F. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 16, n. 2, p. 157-173, 1998.

BAHRUN, A.; JENSEN, C. R.; ASCH, F.; MOGENSEN, V. O. Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition and ABA concentration act as early signals in field grown maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1-13, 2002.

BAISAKH, N.; SUBUDHI, K. P.; PARAMI, P. N. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in a halophyte *Spartina alterniflora* Loisel. **Plant Science**, v. 170, p. 1141–1149, 2006.

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

BELOTI, L. L. **Análise in vitro da expressão de genes de adaptação e de patogenicidade de *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar.** 2008. 51f. Tese (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração: Fitopatologia) Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

BORGES, J. C.; PEROTO, M. C.; RAMOS, C. H. I. Molecular chaperone genes in the sugarcane expressed sequence database (SUCEST). **Genetics and Molecular Biology**, n. 1-4, p. 85-92, 2001.

BRAGA, M. B.; KLAR, A. E. Evaporação e evapotranspiração de referência em campo e estufa orientadas nos sentidos norte-sul e leste-oeste. **Irriga**, Botucatu, v.5, n.3, p.222-8, 2000.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Elsevier-Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 951-965, 1999.

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

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, London, v.25, p.169 – 193, 2000.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT – PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, London, v. 29, p. 23 - 39, 2002.

BUSTIN, S. A; BENES V.; NOLAN T.; PFAFFL W. M. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, London, v.34, p. 597 - 601, 2005.

ÇAKIR, B.; AGASSE, A.; GAILLARD, C.; SAUMONNEAU, A.; DELROT, S.; ATANASSOVA, R. A Grape ASR Protein Involved in Sugar and Absciscic Acid Signaling. **The Plant Cell**, v. 15, p. 2165–2180, 2003.

CARDOSO, L. M.; COLOMBARI, D. S. A.; MENANI, J. V.; DE PAULA, P. M.; CHIANCA-JR, D. A.; COLOMBARI, E. Espécies reativas de oxigênio no controle neurovegetativo da pressão arterial. **X Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular**, v. 39, n. 1, p. 77-88, 2006.

CARLIN, S. D. **Mecanismos fisiológicos de cana-de-açúcar sob efeito da interação dos estresses hídrico e ácido no solo**. 2009. 102 f. Tese - (Doutorado em Agronomia na área de Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

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.

CARMONA, E.; VARGAS, D.; BORROTO, C. J.; LOPES, J.; FERNÁNDEZ, A. I.; ARENCIBIA, A.; BORRÁS-HIDALGO, O. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression during the interaction between sugarcane and Puccinia melanocephala. **Plant Breeding**, v. 123, n. 5, p. 499-501, 2004.

CASAGRANDE, A. A. Tópicos de Morfologia e Fisiologia da Cana-de-açúcar. Jaboticabal: Funep, 1991. 175.

CHAE, A. L.; SUDATB, S.; DUDOITB, S.; ZHUC, T.; S, LUANA. Diverse Transcriptional Programs Associated with Environmental Stress and Hormones in the Arabidopsis Receptor-Like Kinase Gene Family. **Molecular Plant**, v. 2, p. 84-107, 2009.

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

CORDERO, M. J.; RAVENTÓS, D.; SEGUND, B. S. Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. **The Plant Journal**, v. 6, n. 2, p. 141-150, 1994.

CORRÊA, E. M.; POSSIK, P. A. **Academia de Ciência e Tecnologia. A análise de DNA por eletroforese.** 2011. Disponível em:<<http://www.ciencianews.com.br/siteDNA/biomol-index.html>> Acesso em: 06 agosto 2012.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular biology**, Palo Alto, v. 48, p. 355-381, 1997.

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

DAVIES, M. J.; MANSFIELD, T. A. The-role of abscisic acid in drought avoidance. In FT Addicot, ed, *Absciscic Acid*. Prager, New York, p. 237-268, 1983.

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

DEDEMO, G. C.; RODRIGUES, F. A.; ROBERTO, P. G.; BUENO NETO, C.; FRANÇA, S. C.; ZINGARETTI, S. M. Osmoprotection in sugarcane under water déficit condicions. **Plant Stress**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2013.

DINIZ, M. C. **Associação de marcadores (AFLP) com caracteres de interesse agrônômico 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.

EI-BASHITI, T.; HAMAMCI, H.; ÖKTEM, H.A.; YÜCEL, M. Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. **Plant Science**, v.169, p.47-54, 2005.

ELLIS, R. J.; HARTL, F. U. Protein folding in the cell: competing models of chaperon in function. **FASEB Journal**, v. 10, p. 20-26, 1996.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Agência de Informação Embrapa – Cana-de-açúcar.** Disponível em: < <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/Abertura.html>> Acesso em: 01 de fevereiro 2013.

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>. Acesso em: 01 de fevereiro 2013.

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>. Acesso em: 01 de fevereiro 2013.

ENDRES, L.; SILVA, J. V.; FERREIRA, V. M.; BARBOSA, G. V. S. Photosynthesis and Water Relations in Brazilian Sugarcane. **The Open Agriculture Journal**, v. 4, p. 31-37, 2010.

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

EXPRESSION SUIT SOFTWARE HELP; Expression Suite Software Version v.1.0, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA, 2012. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Global/forms/expressionsuite-software-registration.html>. Acesso em: 27 de dezembro 2012.

FARIAS, J. R. B.; BERGAMASCHI, H.; MARTINS, S. R. Evapotranspiração no interior de estufas plásticas. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v.2, p.17-22, 1994.

FEIGE, U.; POLLA, B. S. Hsp70 - a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. **Experientia**, v. 50, p. 979-86, 1994.

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 “Julio de mesquita Filho”, Jaboticabal.

FERRO, M. T.; BARROS, N. M.; DABBAS, K. M.; LAIA, M. L.; KUPPER, K. C.; MORAES, V. A.; OLIVEIRA, J. C. F.; FERRO, J. Á.; ZINGARETTI, S. M. Análise do perfil de expressão dos genes da cana-de-açúcar envolvidos na interação com *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*. **Summa Phytopathology**, v. 33, n. 2, p. 157-166, 2007.

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 CO₂ concentration. **New Phytologist**, v. 172, p. 73-82, 2006.

FULLER, K. J.; ISSELS, R. D.; SLOSMAN, D. O. Cancer and the heat shock response. **European Journal Cancer**, v. 30, n. 1, p. 884-91, 1994.

FUMIS, T. DE F.; PEDRAS, J. F. Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.37, p.449-453, 2002.

G1 AGRONEGÓCIOS GLOBO RURAL. **Seca afeta desenvolvimento das lavouras de cana em AL**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2012/11/seca-afeta-desenvolvimento-das-lavouras-de-cana-em-al.html>>. Acesso 15 de janeiro 2012.

GASCHO, G. J.; SHIH, S. F. Sugarcane. In: TEARE, I. D.; PEET, M. M. (Ed.). **Crop-water relations**. New York: Wiley-Interscience, 1983. p. 445-479.

GILBERT, H. Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. **The Journal of Biological Chemistry**, V. 272, p. 29399–29402, 1997.

GIMENEZ, D. F. J. **Parâmetros biométricos, acúmulo de prolina e identificação de respostas moleculares, por cDNA-AFLP, ao estresse por déficit hídrico em cana-de-açúcar**. 2011. 106 f. Tese – (Doutorado em Agronomia na área de Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

GONZALEZ, A.; ZHAO, M.; LEAVITT, J. M.; LLOYD, A. M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings. **The Plant Journal**, v. 53, p. 814-827, 2008.

GRAÇA, J. P. **Avaliação de parâmetros fisiológicos em cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico**. 2009. 39 f. Tese – (Doutorado em Agronomia na área de Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

GUIMARÃES, E. R.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R.; FERRO, M. I. T.; RAVANELI, G. C.; SILVA, J. A. Acúmulo de prolina em cana-de-açúcar sob estresse hídrico ou submetida ao ataque de cigarrinha-das-raízes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 628-633, 2008.

GUPTA, V.; RAGHUVANSHI, S.; GUPTA, A.; SAINI, N.; GAUR, A.; KHAN, M. S.; GUPTA, R. S.; SINGH, J.; DUTTAMAJUMDER, S. K.; SRIVASTAVA, S.; et al. The water-deficit stress- and red-rot-related genes in sugarcane. **Functional & Integrative Genomics**, v. 10, n. 2, p. 207-214, 2010.

GZIK, A. Accumulation of proline and pattern of α -amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 36, n. 1, p. 29-38, 1996.

HUERTA, C.; FREIRE, M.; CARDEMIL, L. Expression of hsp70, hsp100 and ubiquitin in Aloe barbadensis Miller under direct heat stress and under temperature acclimation conditions. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 2, p. 293-307, 2013.

HUNICKE-SMITH, S. P. **DNA Sequencing Facility (Bionalyzer)**. Disponível em <http://www.icmb.utexas.edu/core/DNA/Bioanalyzer/Bioanalyzer.html>, Acesso: 08 de junho 2012.

IRVINE, J. E. Saccharum species as horticultural classes. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v.98, p. 186-194, 1999.

ISKANDAR, H. M.; CASU, R. E.; FLETCHER, A. T.; SCHMIDT, S.; XU, J.; MACLEAN, D. J.; MANNERS, J. M.; BONNETT, G. D. Identification of drought-response genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. **BMC Plant Biology**, v. 13, p. 11:12, 2011.

KALIFA, Y.; GILAD, A.; KONRAD, Z.; ZACCAI, M.; SCOLNIK, P. A.; BAR-ZVI, D. The water- and salt-stress regulated Asr1 gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. **Biochemical Journal**, v. 381, p. 373–378, 2004.

KAMAUCHI, S.; NAKATANI, H.; NAKANO, C.; URADE, R. Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Journal**, v. 272, p. 3461–3476, 2005.

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.

KIDO, É. A.; FERREIRA NETO, J. R. C.; SILVA, R. L. O.; PANDOLFI, V.; GUIMARÃES, A. C. R.; VEIGA, D. T.; CHABREGAS, S. M.; CROVELLA, S.; BENKO-ISEPPON, A. M. (2012). New Insights in the Sugarcane Transcriptome Responding to Drought Stress as Revealed by Supersage. **Scientific World Journal**, Published online May 2. doi:10.1100/2012/821062

KOCH, G. Reticuloplasmins: a novel group of proteins in the endoplasmic reticulum. **Journal of Cell Science**, v. 87, p. 491–492, 1985.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. Water relations of plants and soil. **Academic Press**, San Diego, p. 495, 1995.

KUMARI, M.; TAYLOR, G. J.; DEYHOLAS, M. K. Transcritomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 279, n. 4, p. 339-357, 2008.

LENKA, S. K.; KATIYAR, A.; CHINNUSAMY, V.; BANSAL, K. C. Comparative analysis of drought-responsive transcriptome in Indica rice genotypes with contrasting drought tolerance. **Plant Biotechnology Journal**, v.9, p.315–327, 2011.

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

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2- $\Delta\Delta$ ct method. **Methods**, New York, v. 25, p. 402-408, 2001.

LONG, T. A.; TSUKAGOSHI, H.; BUSCH, W.; LAHNER, B.; SALT, D. E.; BENFEY, P. N. The bHLH Transcription Factor POPEYE Regulates Response to Iron Deficiency in *Arabidopsis* Roots. **The Plant Cell**, v. 22, p. 2219–2236, 2010.

MEDEIROS, A. H. **Identificação e caracterização de genes induzidos por *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar**. 2008. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-26092008-095927/>>. Acesso em: 28 de janeiro 2013.

MELO, H. C.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.; MELO, L. A.; ALVES, J. D. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, v. 34, n. 2, p. 145-153, 2007.

MEYER, T. N.; DA SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p.181-188, 1999.

NAKAMURA, H.; NAKAMURA, K.; YODOI, J. Redox regulation of cellular activation. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 351-369, 1997.

NARUSAKA, Y.; NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z.; SAKUMA, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; NARUSAKA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Interactions between two cis-acting elements, ABRE, and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis thaliana* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stress. **The Plant Journal**, v. 34, p. 137-148, 2003.

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

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. Uma Inovação Tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ed. 33, 2004.

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

PATAKAS, A.; NIKOLAOU, N.; ZIOZIOIU, E.; RADOGLIOU, K.; NOITSAKIS, B. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. **Plant Science**, v.163, p.361-367, 2002.

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.

PERES, R. F. G.; DINIZ, E. G. **Classificação andrológica por pontos e sua relação com o perfil protéico do plasma seminal de touros nelore**. 2011. Disponível em: <<http://www.scribd.com/doc/32846584/CAP-pontuacao-andrologica-por-pontos>> Acesso em: 23 janeiro 2011.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.29, n.9, p.2002-2007, 2001.

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: 06 agosto 2012.

PRADOS, N. C. **Contribución al estudio de los cultivos enarenados en Almeria: necesidades hídricas y extracción del nutrientes del cultivo de tomate de crecimiento indeterminado en abrigo de polietileno**. 1986. 195 p. Tesis Doctoral. Almeria, Espana.

PREMACHANDRA, G. S.; SANEOKA, H.; FUGITA, K.; OGATA, S. Osmotic adjustment and stomatal response to water deficits in maize. **Journal of Experimental Botany**, v.43, n.256, p.1451-1456. 1992.

QUEIROZ, R. J. B.; SANTOS, D. M. M.; CARLIN, S. D.; MARIN, A.; BANZATTO, D. A.; CAZETTA, J. O. Osmoprotetores em cana-de-açúcar sob efeito da disponibilidade hídrica no solo. **Científica**, Jaboticabal, v.36, n.2, p.107-115, 2008.

QUEIROZ, R.J.B.; SANTOS, D.M.M.; FERRAUDO, A.S.; CARLIN, S.D.; SILVA, M.A. Biochemical and physiological responses of sugarcane cultivars to soil water deficiencies. **Scientia Agricola**, v.68, p.469-476, 2011.

RAHLFS, S.; SCHIRMER, R. H.; BECKER, K. Thethioredoxin system of Plasmodium falciparum and other parasites. **Cell Molecular Life Science**, v. 59, n. 6, p.1024-1041, 2002.

RAY, S.; ANDERSON, J. M.; URMEEV, F. I.; GOODWIN, S. B. (2003) Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Plant Molecular Biology**, v. 53, n. 5, p. 741-754, 2003.

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

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.

RIBEIRO, C. **Análise de expressão gênica e metabolismo primário em cana-de-açúcar: sinalização de açúcares**. 2012. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-17082012-090438/>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2013.

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

ROSENBERG, N. J.; MCKENNEY, M. S.; MARTIN, P. Evapotranspiration in a greenhouse-warmed world: a review and a simulation. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 47, p. 303-320, 1989.

ROXAS, V. P.; LODHI, S. A.; GARRETT, D. K.; MAHAN, J. R.; ALLEN R. D. Stress Tolerance in Transgenic Tobacco Seedlings that Overexpress Glutathione S-Transferase/Glutathione Peroxidase. **Plant Cell Physiology**, v. 41, n. 11, p. 1229–1234, 2000.

SALES, C. R. G.; RIBEIRO, R. V.; MACHADO, D. F. S. P.; MACHADO, R. S.; DOVIS, V. L.; LAGÔA, A. M. M. A. Trocas gasosas e balanço de carboidratos em plantas de cana-de-açúcar sob condições de estresses radiculares. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 3, p. 319-327, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor: Press**. 1989.

SANCHES, R. F. E. **Relações hídricas e respostas ao déficit hídrico da espécie *Bauhinia forficata* Link: mecanismos de manutenção do status hídrico**. 2012. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-14092012-095136/>>. Acesso em: 30/01/2013.

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.

SANTOS, C. F.; LIMA, G. P. P.; MORGADO, L. B. Tolerância e caracterização bioquímica em feijão-caupi submetido a estresse hídrico na pré-floração. **Naturalia**, Rio Claro, v.33, p.34-44, 2010.

SARKAR, N. K.; KUNDNANI, P.; GROVER, A. Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*), Dec 21, [Epub ahead of print], 2012.

SAUTER, A.; DAVIES, W. J.; HARTUNG, W. The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 363, p.1991-1997, 2001.

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.854-862, 2005.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought stress. In: Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants. **Biotechnology Intelligence Unit, R.G. Landes Company**, Austin, Texas, USA, 1999.

SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 10763–10768, 2001.

SHIU, S.; KARLOWSKI, W. M.; PAN, R.; TZENG, Y.; MAYER, K. F. X.; LI, W. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. **Plant Cell**, v. 16, p. 1220–1234, 2004.

STOLF, R. **Identificação e análise da expressão de genes relacionados com tolerância à seca em soja através de microarranjos de dna e pcr em tempo real**. 2007. 125f. Tese – (Doutorado em Agronomia na área de Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

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

TAMAYO, M. C.; RUFAT, M.; BRAVO, J. M.; SEGUNDO, B. S. Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae. **Planta**, v. 211, n. 1, p. 62-71, 2000.

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

ÚNICA. União da Agroindústria de Cana-de-açúcar. **Setor Sucroenergético/Mapa de Produção**. Disponível em <<http://www.unica.com.br/mapa-da-producao/>>. Acesso em: 16/01/2012.

URSINI, F.; HEIM, S.; KIESS, M.; MAIORINO, M.; ROVERI, A.; WISSING, J.; FLOHÉ, L. Dual function of the seleno protein PHGPx during sperm maturation. **Science**, v. 285, p. 1393–1396, 1999.

VANDESOMPELE, J. O.; PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 12 pages, 2002.

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

VINECKY, F.; ALVES, G. S. C.; VIEIRA, N. G.; FREIRE, L. P.; HEIMBECK, I. G. R.; FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; SILVA, V. A.; MARRACCINI, P.; Andrade A. C. Análises da expressão gênica por pcr quantitativo em tempo real (qpcr) de genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro. **VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 22 a 25 de Agosto de 2011, Araxá- MG.

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

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant response to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 218, n. 1, p. 1-14, 2003.

WANG, X. T.; WANG, T. Y.; LI, Y. Cloning and Bioinformatic Analysis of Protein Disulfide Isomerase Gene in Maize (*Zea mays* L.). **Agricultural Science Research Paper** 122 pages, 2012.

YOSHIDA, R.; HOBO, T.; ICHIMURA, K.; MIZOGUCHI, T.; TAKAHASHI, F.; ARONSO, J.; ECKER, J. R.; SHINOZAKI, K. ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. **Plant Cell Physiology**, Kioto, v. 43, n. 12, p. 1473-1483, 2002.

ZHU, J.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, p. 253-277, 1997.