

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

ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA ENTRE CULTIVARES DE
CANA-DE-AÇÚCAR CONTRASTANTES PARA A
TOLERÂNCIA À SECA

Gisele Cristina Dedemo

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Agosto de 2011

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

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA ENTRE CULTIVARES DE
CANA-DE-AÇÚCAR CONTRASTANTES PARA A
TOLERÂNCIA À SECA**

Gisele Cristina Dedemo

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro

Coorientador: Prof. Dr. Miguel Angelo 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

Agosto de 2011

D299e Dedemo, Gisele Cristina
Estudo da expressão gênica entre cultivares de cana-de-açúcar contrastantes para a tolerância à seca / Gisele Cristina Dedemo. -- Jaboticabal, 2011
xi, 108 f. : il. ; 28 cm

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

Orientadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro

Coorientador: Miguel Angelo Mutton

Banca Examinadora: André Luiz Julien Ferraz, Luciana Rossini Pinto, Rinaldo Cesar de Paula, Samira Domingues Carlin Cavalari

Bibliografia

1. Estresse abiótico. 2. *Saccharum* spp. 3. cDNA-AFLP. 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

GISELE CRISTINA DEDEMO – nascida em 21 de fevereiro de 1977, no município de Ribeirão Preto, São Paulo, filha de Ulysses Dedemo e Maria do Carmo Bertolai Dedemo. Formou-se como bacharel e licenciada em Ciências Biológicas pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP), respectivamente, em dezembro de 2001 e de 2002. Bióloga, inscrita no Conselho Regional de Biologia 1ª Região (CRBio-1) sob o nº 68782/01-D. Em março de 2004 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticabal), obtendo o título de mestre em abril de 2006. Em março de 2007 iniciou o curso de doutorado vinculado ao mesmo Programa de Pós-Graduação. Em agosto de 2009, tornou-se funcionária pública municipal da Secretaria da Saúde da Prefeitura Municipal de São Paulo, atuando como Especialista em Saúde (Bióloga), na Vigilância Sanitária da Supervisão de Vigilância em Saúde da Freguesia do Ó/Brasilândia (SUVIS-FÓ/BRAS), de agosto de 2009 a setembro de 2010.

*“Sinto-me em luta comigo mesmo, luta essa que defino com estas palavras:
Sei o que devo ser e ainda não sou, mas rendo graças a Deus por estar
trabalhando, embora que lentamente, por dentro de mim próprio, para
chegar, um dia, a ser o que devo”.*

Chico Xavier

“Quem sabe, faz. Quem compreende, ensina”

Lee S. Shulman

*Aos meus queridos pais, Ulysses e Maria do Carmo e a minha querida irmã, Gislaine
Agradeço a vocês por tudo que sou e que tenho na vida.*

*Ao meu querido esposo, Vinícius,
Agradeço por ser o meu grande parceiro e amigo em todas as nossas conquistas e
frente aos desafios da vida.*

A vocês, que amo profundamente e que são o maior sentido de minha vida...

Dedico

"Amigo é...

*Aquela pessoa que o tempo não apaga,
que a distância não esquece,
que a maldade não destrói.*

*É um sentimento que vem de longe,
que ganha lugar no seu coração
e você não substitui por nada.*

*É alguém que você sente presente,
mesmo quando está longe...
Que vem para o seu lado quando você está sozinho
e nunca nega um sentimento sincero.*

*Ser amigo não é coisa de um dia,
são atos, palavras e atitudes
que se solidificam no tempo
e não se apagam mais.
Que ficam para sempre como tudo que é feito
com o coração aberto."*

Autor Desconhecido

"A gente não faz amigos, reconhece-os"

Vinícius de Moraes

A todos os meus Inesquecíveis Amigos...

Homenageio

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a DEUS, Pai e Amigo incondicional, por permitir-me a existência e por compreender minhas dúvidas e limitações, dando-me as experiências necessárias para meu crescimento espiritual...

- À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Inês T. Ferro, a quem devo sincero agradecimento pelo meu crescimento profissional e pessoal, graças às inúmeras oportunidades concedidas com confiança, apoio, conselhos e amizade. Eu jamais me esquecerei de sua mão estendida em cada momento de dificuldade e serei eternamente grata!

- Ao meu coorientador, Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton, por todas as orientações durante a condução do experimento e por intermediar a obtenção das cultivares de cana-de-açúcar e do solo.

- Às pesquisadoras Dra. Luciana Rossini Pinto e Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza do Centro de Cana-de-Açúcar (IAC/Ribeirão Preto, S.P., Brasil) por toda a imensa colaboração em seu laboratório, auxílio e orientação durante a padronização da reação de amplificação seletiva para o cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida e por possibilitar a realização da eletroforese vertical e do procedimento de coloração dos géis. Agradeço também a todos os colegas e novos amigos do laboratório de Cana, em especial, a Cibele, a Letícia, a Taís e a Débora.

- Aos amigos e companheiros de trabalho: Juliana Vantini, Dani, Arthur Rossini, Osmar e Tião, pelo incessante apoio durante toda a condução experimental. Obrigada pela preciosa amizade que tornou este trabalho repleto de aprendizados, resultados e inesquecíveis lembranças.

- Ao Julinho, Flávia e Ana por todo o auxílio durante o desenvolvimento do presente trabalho, em especial, pelo fornecimento das células de *E. coli*, que considero, as mais

químicoCOMPETENTES do mundo!!! ;-) Obrigada, meus amigos, sem vocês eu jamais teria concluído este trabalho!!!

- Ao Fabrício, pela amizade regada de serenidade e sabedoria e pelos ensinamentos e auxílio durante a realização do experimento de cDNA-AFLP e análise dos resultados.

- Aos meus Eternos e Amados “Amigos do LBM”!!! Obrigada por todos estes anos de convívio, pela preciosa amizade, solidariedade, infinita paciência e pelos inesquecíveis momentos de alegria e de consolo, de lágrimas e de risos & sorrisos: Juju Vantini, Flávia, Karina, Dani, Julinho, Fabrício, Mariza, Agda, Renata, Paula, Elaine, Mônica, Flavinha, Juliana “Gosminha”, Andréia, Rafael, Gustavo Henrique, Splinter, Paulo Rosa, Juliana De Antonio, Roseli, Fabiana, Paula Demore, Jú Dezajacomo, Vanessa, Joice, Ana, Mayara, Aline, Lúcia, Priscila, Mariane, Guilherme, Gustavo, Jaqueline, Amanda, Lucília, Mariana, Teresa, Bruna e a todos os demais amigos que passaram pelo LBM. Amo vocês pra sempre!!!!

- Aos amigos do Depto. de Tecnologia pela preciosa amizade tão fundamental nos momentos de alegria e de dificuldade: Dona Maria, Andréia, Renata, Bethy, Wlady, João Carlos, Fátima(s) e Sérgio, bem como a todos os meus muitos amigos igualmente queridos do Campus da Unesp de Jaboticabal.

- À UNESP/Jaboticabal, ao nosso coordenador, Prof. Dr. Rinaldo César de Paula e aos demais professores do Programa de Pós-Graduação (Genética e Melhoramento de Plantas) pela importante contribuição no aperfeiçoamento de minha formação profissional e pelo inesquecível convívio e amizade durante todos os anos que estive em Jaboticabal.

- À USP/Ribeirão Preto pela minha formação profissional. - A todos os queridos e inesquecíveis amigos da XXXV Turma de Biologia e àqueles cuja convivência durante minha vida acadêmica em Ribeirão Preto enriqueceu-me de lindas e inesquecíveis lembranças e muito aprendizado.

- À Prof. Dra. Elenice Moura Varanda (FFCLRP-USP/Ribeirão Preto) que, mais que uma Mestre, foi para mim uma verdadeira mãe. Tu és para mim o meu melhor exemplo de profissional e de educadora, agindo sempre com muita ética, retidão e humanidade. Devo-lhe muito pelo o que hoje sou e por cada conquista em minha vida!

- Às doutoras integrantes da banca do exame de qualificação, Dra. Maria Inês T. Ferro, Dra. Luciana Rossini Pinto, Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho, Dra. Samira Domingues Carlin Cavallari, e Dra. Karina Maia Dabbas, pela disponibilidade em participar da banca examinadora e pelas importantes contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho e da minha formação acadêmica.

- Aos doutores componentes da comissão examinadora: Dra. Maria Inês T. Ferro, Dra. Luciana Rossini Pinto, Dra. Samira Domingues Carlin Cavallari, Dr. Rinaldo Cesar de Paula e Dr. André Luiz Julien Ferraz, pela disponibilidade em participar da banca de defesa da tese de doutorado e por todas as contribuições que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho e da minha formação acadêmica.

- Agradeço a todos os que trabalham na SUVIS - Freguesia do Ó/Brasilândia (Prefeitura Municipal de São Paulo) pelo inesquecível convívio, amizade e rico aprendizado não só profissional como também de vida, em especial, aos meus queridos amigos: Fêr, Carminha, Fêzinha, Nanci, Marly, Cris, Carmen, Fabiano, Lúcia, Cida, Roseli, Maira e Cícero. Embora não estejam diretamente relacionados ao exercício do presente trabalho foram fundamentais para o meu crescimento como Bióloga e para o meu amadurecimento emocional e humano. Manifesto aqui minha eterna gratidão e estima!

- A todos os brasileiros que, graças às contribuições do seu trabalho diário, possibilitam a existência dos órgãos de fomento como FAPESP, CAPES e CNPq, os quais disponibilizaram o auxílio financeiro necessário à realização do presente estudo.

A todos os meus sinceros agradecimentos

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
III. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Cana-de-Açúcar: Origem e Importância da Cultura	5
3.2. Deficiência Hídrica do Solo: um Estresse Abiótico.....	9
3.3. Estudo da Expressão Gênica Dependente do Genótipo em Plantas sob Estresse Hídrico.....	11
3.4. A Técnica de cDNA-AFLP.....	13
IV. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Material Vegetal e Condução Experimental	18
4.2. Coleta da Folha+1 da Cana-de-Açúcar.....	21
4.3. Extração do RNA total.....	22
4.3.1. Quantificação do RNA total	24
4.3.2. Análise da Integridade do RNA total	24
4.4. Síntese dos cDNAs Dupla-Fita.....	25
4.4.1. Procedimento para a Síntese da 1ª Fita dos cDNAs.....	25
4.4.2. Procedimento para a Síntese da 2ª Fita dos cDNAs.....	25
4.4.3. Purificação dos cDNAs utilizando o Método Fenol-Clorofórmio	26
4.5. Técnica de cDNA-AFLP	27
4.5.1. Reação de Restrição.....	27
4.5.2. Reação de Ligação	28
4.5.3. Reação de Amplificação Pré-Seletiva	29
4.5.4. Determinação das Combinações de Primers para a Reação Seletiva	30
4.5.5. Reação de Amplificação Seletiva.....	31
4.6. cDNA-AFLP em Sequenciador Automático de DNA	33
4.7. cDNA-AFLP em Eletroforese Vertical com Gel de Poliacrilamida 6%.....	34

4.8. Detecção, Recuperação e Reamplificação dos FDTs	38
4.9. Purificação dos FDTs	39
4.10. Clonagem dos FDTs	41
4.11. Preparação do DNA Plasmidial	42
4.12. Sequenciamento dos FDTs	44
4.13. Análise dos FDTs	45
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Experimento de Estresse Hídrico em Cana-de-Açúcar	47
5.2. Qualidade do RNA Total e dos cDNAs Dupla-Fita e Técnica de cDNA-AFLP	50
5.3. Análise do cDNA-AFLP, Reamplificação e Sequenciamento dos FDTs	51
5.4. Receptor de Fitosulfocina: um Peptídeo Hormonal das Plantas	66
5.5. Fator de Transcrição MADS-box	68
5.6. Proteína Associada à Senescência	71
5.7. Elementos de Transposição do DNA	73
5.8. Outros FDTs Expressos Exclusivamente pelas Cultivares Tolerantes de Cana-de-Açúcar	81
5.9. Sequenciamento dos FDTs Remanescentes e Validação dos Resultados através da PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR).	88
VI. CONCLUSÕES	89
VII. REFERÊNCIAS	90

ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA ENTRE CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR CONTRASTANTES PARA A TOLERÂNCIA À SECA

RESUMO - A cana-de-açúcar tem adquirido crescente importância no cenário mundial, não somente pela produção do açúcar, mas devido ao grande potencial como cultura bioenergética, sendo utilizada na produção do etanol, uma fonte energética alternativa, ecologicamente limpa e renovável e como co-geradora de energia elétrica através da queima do bagaço. O Brasil destaca-se mundialmente como o maior produtor da cultura e exportador de açúcar e etanol. Porém, esta cultura está sujeita a diferentes estresses ambientais, dentre os quais, a disponibilidade de água representa o principal fator que influencia o crescimento e o desenvolvimento vegetal e, conseqüentemente, a produtividade. Dessa forma, para a identificação dos possíveis genes envolvidos nas respostas de tolerância à seca em cana-de-açúcar, realizou-se, por meio da técnica de cDNA-AFLP, a análise comparativa do perfil de transcritos de duas cultivares tolerantes, SP83-5073 e RB867515 com o perfil de expressão da cultivar sensível à seca, SP86-155, quando submetidas a suspensão da rega por 1, 3, 5 e 10 dias. Com 14 combinações de *primers* seletivos *EcoRI/MseI*, foram detectados no gel de poliacrilamida, 1.316 fragmentos derivados de transcritos (FDTs) que foram diferencialmente expressos entre as cultivares tolerantes e a sensível, submetidas ao estresse hídrico (1, 3, 5 e 10 dias). Destes, 630 FDTs foram identificados na cultivar SP83-5073 e 686 FDTs na cultivar RB867515. A análise comparativa do perfil de expressão associado ao genótipo da cana-de-açúcar revelou fragmentos de transcritos similares a genes envolvidos em eventos moleculares relacionados às respostas das plantas a diferentes estresses, inclusive ao causado pela seca. Estes genes atuam na sinalização hormonal, regulação da transcrição gênica, senescência, transposição de DNA, transporte de aminoácidos, respiração e metabolismo de carboidratos. Entretanto, nove FDTs possivelmente representam genes ainda desconhecidos e podem estar desempenhando funções importantes nas respostas da cana-de-açúcar à seca e assim contribuindo para o caráter de tolerância.

Palavras-chave: *Saccharum* spp, estresse abiótico, cDNA-AFLP, expressão diferencial.

GENE EXPRESSION STUDY BETWEEN SUGARCANE CULTIVARS WITH CONTRASTING DROUGHT TOLERANCE

SUMMARY – The sugarcane has increased importance in the world not only for sugar production, but also due to the great potential as a generator energy because ethanol production, it is a renewable, alternative energy source, ecologically clean and as energy cogeneration through burning of bagasse. Brazil is the world's largest crop producer and exporter of sugar and ethanol. However, this crop is exposed to different kinds of stress, among which; the availability of water is noticeable as the main factor that negatively influences the vegetable growth and, therefore, the productivity. In order to identify the possible genes involved in the responses to drought tolerance in sugarcane crops, the comparative analysis of transcripts profile from two tolerant cultivars, SP83-5073, RB867515 and the sensitive cultivar SP86-5073, after has been submitted to the interruption of irrigation for 1, 3, 5 and 10 days were performed using the cDNA-AFLP technique. With 14 combinations of *EcoRI/MseI* selective *primers*, there was detected on a polyacrylamide gel, 1,316 transcript-derived fragments (TDFs) differently expressed between tolerant and sensitive cultivars submitted to water deficit (1, 3, 5 and 10 days). From these, 630 TDFs were identified on the cultivar SP83-5073 and 686 TDFs corresponded to the cultivar RB867515. The comparative analysis of genotype dependent gene expression profile in sugarcane revealed fragments similarity with genes involved in many molecular events related to the responses of plants to different stresses, including those caused by drought. These genes work in hormonal signaling, regulation of gene transcription, senescence, DNA transposition, transport of amino acids, respiration and metabolism of carbohydrates. However, nine TDFs possibly represent still unknown genes, which may be developing important roles on the responses to drought and contributing to the trait of tolerance.

Keywords: *Saccharum* spp, abiotic stress, cDNA-AFLP, differential expression

I. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar é de grande importância nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo de especial significado econômico para alguns países da América Central e do Sul, principalmente para o Brasil, que é o maior produtor e exportador mundial de açúcar e etanol (SACIOTO, 2003). No Brasil, a cana-de-açúcar é utilizada como matéria prima para a produção de açúcar e como cultura bioenergética para a produção de etanol, combustível considerado potencialmente global, em razão de amenizar dois grandes problemas mundiais, a escassez do petróleo e o efeito estufa. Além disso, é também utilizada na co-geração de energia elétrica através da queima do bagaço (DINIZ, 2007; WACLAWOVSKY et al., 2010), permitindo assim à cultura ocupar um patamar de crescente destaque no cenário mundial.

Em ambientes naturais e agricultáveis, as plantas freqüentemente crescem sob condições desfavoráveis, coletivamente chamadas de estresses abióticos e bióticos. Tais estresses podem retardar o crescimento e o desenvolvimento vegetal, reduzir a produtividade e, em casos extremos, levar a planta à morte (QIANG et al., 2000; JIANG & ZHANG, 2002; OZTURK et al., 2002; XIONG et al., 2002). A baixa disponibilidade de água está entre as principais condições adversas que influenciam na produtividade das culturas agrícolas (BRUCE et al., 2002; KOTCHONI & BARTELS, 2003; KOSMAS et al., 2006). O manejo da água na cultura da cana-de-açúcar é crítico para a obtenção de altas produtividades de colmos e açúcar, que frequentemente são limitadas tanto pelo excesso quanto pela deficiência de água. Um suprimento adequado de água é necessário para a brotação e o crescimento vegetativo, sendo as maiores quantidades de água requeridas durante o período de máxima formação da produção (OLIVEIRA, 2010).

A tolerância ao estresse hídrico é uma característica complexa que envolve diversas vias adaptativas metabólicas e morfológicas. Os genes responsivos à seca codificam proteínas envolvidas na sinalização do estresse, na regulação da expressão

gênica e no controle e reparo dos danos celulares ocasionados pelo estresse. Os genótipos que diferem em tolerância devem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas na expressão gênica quando submetidos a períodos de seca (CASAGRANDE et al., 2001; LENKA et al., 2011). A identificação e a caracterização de genes relacionados à tolerância, por meio de estudos comparativos do transcriptoma de cultivares contrastantes para a tolerância à seca, poderão auxiliar na compreensão da base evolutiva dos mecanismos de adaptação ao estresse, facilitando assim o melhoramento das espécies cultivadas via engenharia genética ou melhoramento assistido (LENKA et al., 2011).

No Brasil, as novas regiões de expansão da cana-de-açúcar apresentam-se predominantemente ocupadas por pastagens e caracterizadas por um inverno seco, com períodos de deficiência hídrica mais acentuados do que nas regiões tradicionalmente ocupadas pela cultura. Portanto, a utilização de cultivares, que correspondam a genótipos com maior tolerância, torna-se a maneira mais econômica de contornar os prejuízos causados pela seca (PINCELLI, 2010). Tais considerações reforçam a necessidade do enfoque sistemático nos estudos sobre o estresse hídrico, com ênfase nas diferenças genéticas entre genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para a tolerância à seca.

O estudo do transcriptoma representa um recurso poderoso para a análise global das respostas das plantas aos estresses ambientais (LESTARI et al., 2006). Uma variedade de técnicas moleculares está disponível para a identificação e a clonagem de genes diferencialmente expressos, tais como o *Differential Display*, os arranjos de cDNAs, o cDNA-AFLP entre outras.

A técnica de cDNA-AFLP (cDNA-*Amplified Fragment Length Polymorphism*) é uma ferramenta de baixo custo, rápida, de boa reprodutibilidade e sensibilidade para o estudo da expressão gênica e tem sido utilizada com sucesso na discriminação em larga escala de genes diferencialmente expressos em plantas (BACHEM et al., 1998; LESTARI et al., 2006), inclusive em cana-de-açúcar (CARMONA et al., 2004). O cDNA-AFLP reduz muito o número de falsos positivos por meio da ligação de adaptadores aos cDNAs dupla-fita digeridos associada às condições de PCR de alta estringência

(CAMPALANS et al., 2001; LESTARI et al., 2006). Além disso, permite avaliar os transcritos em um dado sistema biológico, utilizando apenas pequenas quantidades de material inicial (MERTZ et al., 2009), com as vantagens adicionais de não requerer qualquer informação prévia das sequências (PATHAN et al., 2007) e de ser capaz de detectar transcritos pouco abundantes (KIVIOJA et al., 2005).

Portanto, no presente trabalho foi realizada, por meio da técnica de cDNA-AFLP, a análise comparativa do perfil de expressão gênica de genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para a tolerância à seca. Os resultados aqui apresentados permitem ampliar a compreensão dos mecanismos de tolerância da cultura à deficiência hídrica e abrem perspectivas para a futura utilização dos genes detectados, no desenvolvimento de maior tolerância de cultivares de cana altamente produtivas, viabilizando o seu cultivo em áreas sujeitas à restrição hídrica.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a expressão gênica dependente do genótipo em cana-de-açúcar, sob estresse hídrico, através da análise comparativa entre cultivares contrastantes para a tolerância à seca.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar os fragmentos derivados de transcritos (FDTs) diferencialmente expressos entre as cultivares de cana-de-açúcar tolerantes e sensível à seca, submetidas à suspensão da rega;
- Reamplificar e seqüenciar os FDTs expressos somente nas cultivares tolerantes de cana-de-açúcar;
- Determinar as proteínas e as funções correspondentes aos FDTs através de análises *in silico*, utilizando ferramentas de bioinformática para a pesquisa de similaridade de sequência contra os bancos de dados públicos não redundantes de proteínas e de nucleotídeos.

III. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Cana-de-Açúcar: Origem e Importância da Cultura

De acordo com a classificação taxonômica, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Cyperales, família Poaceae e gênero *Saccharum* (EMBRAPA, 2011). A família Poaceae também conhecida como família das gramíneas é de grande importância por incluir cereais como o milho, trigo, arroz e sorgo, bem como muitas culturas forrageiras (PALHARES, 2010). O gênero *Saccharum* possui seis espécies: *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* e *S. edule* e as cultivares comerciais correspondem a híbridos poliplóides e aneuplóides resultantes do cruzamento interespecífico de *Saccharum officinarum*, uma “cana nobre” com as outras espécies do gênero, principalmente, *S. spontaneum* (BESSE et al., 1998; NOGUEIRA, 2004).

A cana-de-açúcar é uma gramínea tropical, que tem sido cultivada a mais de 4000 anos, mas a sua origem provável data de seis mil anos a.C. (antes de Cristo) no Sudeste Asiático. Apesar de existir incertezas sobre a determinação exata do local, acredita-se que seja originária das regiões da Nova Guiné e Indonésia (BORRÁS-HIDALGO et al., 2005; COPERSUCAR, 2010; FERRARI, 2010).

Atualmente, a cana-de-açúcar é uma das espécies vegetais mais cultivadas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (MARTINS, 2004; NOGUEIRA, 2004). O Brasil é o maior produtor mundial de cana, seguido por Índia, Tailândia e Austrália. Em nosso país, a cana-de-açúcar é cultivada nas regiões centro-sul, norte e nordeste, permitindo duas safras por ano e a cultura continua em expansão com a instalação e funcionamento de novas usinas. Além disso, o Brasil é também o maior produtor de açúcar e etanol, produzindo durante todo o ano e abastecendo os mercados interno e externo. Portanto, o setor sucroenergético está entre os mais competitivos do mundo (BARBIERI, 2005; UNICA, 2010; CONAB, 2011).

Com a crescente preocupação mundial com o ambiente, vários países estão buscando reduzir o uso de combustíveis fósseis, com o intuito de diminuir a carga poluidora, seja pela substituição destes combustíveis ou pela adição de outros combustíveis menos poluentes. Dentre as fontes de energia renováveis existentes atualmente, a cana-de-açúcar é uma das melhores opções, podendo ser utilizada tanto na produção de etanol hidratado, uma fonte alternativa de combustível, como na produção de etanol anidro, um aditivo que melhora o desempenho energético e ambiental da gasolina (MAULE et al., 2001).

De acordo com o terceiro levantamento da safra de cana-de-açúcar de 2010/11, realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) em cooperação com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a área de cana colhida destinada à atividade sucroenergética está estimada em 8.033,6 mil hectares, distribuída em todos estados produtores. A área colhida teve aumento de 8,40% em relação à safra anterior e esse aumento pode ser explicado a partir do crescimento natural das áreas das usinas recentemente instaladas, das áreas de renovação e do aumento de moagem em determinadas unidades produtivas. Em relação à área total, o Estado de São Paulo continua sendo o maior produtor com 54,23% (4.357,01 mil hectares), seguido por Minas Gerais com 8,1% (649,94 mil hectares), Paraná com 7,25% (582,32 mil hectares), Goiás com 7,46% (599,31 mil hectares), Alagoas com 5,46% (438,57 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 4,93% (396,16 mil hectares) e Pernambuco com 4,32% (346,82 mil hectares).

Já a produtividade média brasileira foi estimada em 77.798 kg/ha. Assim, o rendimento foi 4,6% menor em comparação com a safra 2009/10. A redução da produtividade foi conseqüência das chuvas abaixo da média histórica na região centro-sul. Levando em conta o rendimento da safra anterior, o centro-oeste apresenta redução de 2,91%, o sudeste de 5,60% e no sul a perda foi de 11,20%. No norte e nordeste a má distribuição das chuvas impactou o rendimento na maioria dos Estados. Entretanto, a produtividade estimada é de aumento para a região norte (22,92%) e de 2,0% para o nordeste. O Centro-Sul tem condições de produção melhores do que as regiões norte-nordeste, o que explica a diferença de produtividade observada no

levantamento. Importante citar que as condições climáticas adversas, observadas no decorrer de 2010, poderão afetar a produtividade da próxima safra (2011/2012), uma vez que a estiagem tende a dificultar o processo de desenvolvimento da lavoura (CONAB, 2011).

A previsão do total de cana moída na safra 2010/11 é de 624.991 mil toneladas, com incremento de 3,40% em relação à safra 2009/10, o que significa que haverá 20.477 mil toneladas a mais para moagem nesta safra. Com exceção da região sul, que teve a produção reduzida em 3,40%, as demais regiões apresentam incremento da matéria prima, destacando-se as regiões norte (39,20%) e centro-oeste (24,20%).

A previsão é de que do total da cana esmagada, 46,2% serão destinadas à produção de açúcar, o que deve gerar 38.675,5 mil toneladas do produto. A produção de açúcar pode ser 16,93% maior em comparação com a safra anterior. O aumento se observa na região norte (52,59%), nordeste (9,39%), centro-oeste (48,07%), sudeste (13,98%) e sul (25,91%). Podem-se destacar, na estimativa de aumento na produção de açúcar, os Estados do Alagoas, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco e São Paulo. Do total da produção de cana-de-açúcar, 336.276,1 mil toneladas (53,8%), serão destinadas à produção de etanol, gerando um volume total de 27.669,55 milhões de litros. No que se refere ao etanol anidro, a produção estimada é de 8.107,5 milhões de litros, com estimativa de crescimento de 16,66% em relação à safra 2009/2010. Em se tratando de etanol hidratado, a produção estimada é de 19.592,1 milhões de litros, com aumento de 4,14% em relação à safra anterior. A produção está concentrada nas regiões centro-oeste e sudeste que respondem por 87,46% do etanol produzido no País, sendo os maiores produtores os estados de São Paulo (54,26%), Goiás (11,61%), Minas Gerais (10,35%), Mato Grosso do Sul (7,39%) e Paraná (6,96%) (CONAB, 2011).

A indústria sucroenergética constitui um dos setores do agronegócio mais importantes para a economia primária brasileira (PRADO et al., 2002), sendo responsável pela geração de milhões de empregos diretos e indiretos, o que evidencia a grande importância social da cultura. Ela mantém o maior sistema de produção de energia comercial de biomassa do mundo, através do etanol (substituindo cerca de 20%

da gasolina) e da queima do bagaço (equivalente a 11 milhões de toneladas de óleo), sendo esta última, também uma fonte alternativa para a resolução da questão energética. Praticamente toda a energia gasta na fabricação de açúcar e de etanol é oriunda desta fonte, gerando inclusive excedentes para serem vendidos no mercado. Além de se destacar pelo aproveitamento racional da biomassa vegetal, gerando energia elétrica através da queima do bagaço, a vinhaça, efluente líquido da fabricação de etanol e açúcar e o resíduo sólido conhecido como torta de filtro são utilizados na adubação dos canaviais, sendo excelentes fontes de potássio e de outros nutrientes. Ademais, a cana-de-açúcar pode ser também utilizada na produção de papel e de plásticos biodegradáveis, de açúcares não calóricos, de compostos químicos de interesse farmacêutico, de produtos para a indústria etanol-química e como recurso forrageiro na alimentação suplementar dos ruminantes no período de estiagem. Neste sentido a cana é hoje, uma das culturas que mais se destaca do ponto de vista econômico, social e ambiental (SACILOTO, 2003; MARTINS, 2004; DINIZ, 2007).

A cana-de-açúcar é bastante influenciada pelas condições edafoclimáticas. Fatores como precipitação pluviométrica, temperatura, umidade relativa e insolação são condicionantes climáticos importantes na determinação das disponibilidades hídrica e térmica para a cultura. Estes parâmetros têm efeito sobre o comportamento fisiológico das plantas em relação ao metabolismo de crescimento e desenvolvimento dos colmos, florescimento, maturação e produtividade. Da mesma forma, o relevo, a geologia e a geomorfologia, que influenciam as características pedológicas, também estabelecem implicações diretas sobre o manejo da cultura, considerando a fertilidade do solo e todos os aspectos a ela relacionados (MARTINS, 2004).

A produtividade da cana-de-açúcar é regulada também por fatores como cultivar, práticas culturais (controle da erosão, plantio, erradicação de plantas invasoras, descompactação do solo), colheita (maturação, corte, carregamento e transporte), controle de pragas e doenças, dentre outros (ORLANDO FILHO et al., 1994). Portanto, para aumentar os atuais índices de produtividade nos próximos anos, torna-se necessário, dentre outros aspectos, o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas ao clima, ao tipo de solo e com maior concentração de sacarose (UNICA, 2004). Tendo em

vista que o Brasil apresenta grande potencial para a expansão da cultura da cana-de-açúcar (BARBIERI, 2005), o desenvolvimento de cultivares com maior tolerância aos estresses, tal como a seca, representa um fator importante para o seu cultivo em áreas com solos que apresentem deficiência hídrica como os encontrados nas regiões de cerrado do centro-oeste. Segundo a CONAB (2011), a estiagem prolongada na região centro-sul e a distribuição irregular das chuvas na região norte e nordeste explicam a redução da produtividade da cana na última safra e nas lavouras que serão colhidas na safra 2011/12 os efeitos da estiagem poderão também refletir na produtividade. Estas informações reforçam a importância do desenvolvimento de pesquisas, tal como o presente estudo, para a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca da cana-de-açúcar.

3.2. Deficiência Hídrica do Solo: um Estresse Abiótico

De acordo com KACPERSKA (2004) os estresses representam condições do meio, potencialmente adversas, que afetam o desenvolvimento vegetal e disparam uma ampla gama de respostas a partir da alteração da expressão gênica e do metabolismo celular, modificando a taxa de crescimento e, conseqüentemente, a produtividade. As plantas estão frequentemente expostas a múltiplos estresses abióticos, que desempenham importante papel na determinação de como o solo e o clima limitam a distribuição das espécies (VERSLUES et al., 2006). Tais condições desfavoráveis podem inclusive levar, em casos extremos, à morte das plantas (CHEN & MURATA, 2002).

Um exemplo de estresse abiótico é o estresse hídrico, o qual pode ser resultado da deficiência hídrica ou do excesso de água no ambiente, sendo o primeiro mais comum. Com exceção das áreas que utilizam a irrigação para o fornecimento de água às culturas, a disponibilidade de água é regida pela distribuição das chuvas e pelo potencial de armazenamento de água no solo, o qual é condicionado pelas características físico-químicas. Dentre todos os fatores ambientais, a deficiência hídrica é a que mais frequentemente limita o desenvolvimento das plantas e, por conseguinte, sua produtividade e distribuição (CORREIA & NOGUEIRA, 2004; BARTELS &

SUNKAR, 2005). A severidade do estresse dependerá de sua intensidade, frequência e duração, bem como do genótipo e do estágio de desenvolvimento da planta (YORDANOV et al., 2003).

A deficiência hídrica diminui o potencial hídrico do solo, interferindo diretamente na eficiência do uso da água pelas plantas, as quais necessitam então desenvolver um potencial mais negativo, de modo a manter o gradiente entre o solo e a planta. O decréscimo de água no solo diminui o potencial de água na folha e sua condutância estomática, promovendo o fechamento dos estômatos (YORDANOV et al., 2003). Esse fechamento bloqueia o influxo de CO₂ para as folhas, o que diminui o acúmulo de fotoassimilados, reduzindo a produtividade da planta (OBER & LUTERBACHER, 2002). A cana-de-açúcar, muito embora seja uma planta de metabolismo fotossintético C₄, que permite minimizar a transpiração e utilizar, de forma mais eficiente, a água e a baixa concentração de CO₂ presentes na planta para a manutenção da fotossíntese, apresenta uma elevada demanda de água durante o ciclo vegetativo, necessitando de 250 partes de água para formar uma parte de matéria seca (MAULE et al., 2001).

A cana apresenta os seguintes estádios fenológicos: brotação e emergência; perfilhamento; crescimento dos colmos e maturação dos colmos (GASCHO & SHIH, 1983). O efeito do estresse hídrico sobre o crescimento e a produtividade é variável durante o ciclo da cultura, sendo os dois primeiros estádios os mais prejudicados. Em estudo sobre as épocas de irrigação em cana-de-açúcar, foram observadas que as maiores reduções da produtividade ocorreram devido à deficiência hídrica nos primeiros oito meses do ciclo da cana planta (DELGADO-ROJAS & BARBIERI, 1999). Sendo assim, estudos que permitam a identificação de genes-alvos que se relacionam positivamente com a tolerância à deficiência hídrica devem ser considerados e realizados, preferencialmente, na idade em que a cana-de-açúcar é mais sensível ao estresse.

As plantas podem perceber a ocorrência dos estresses abióticos e elicitar respostas apropriadas, alterando o seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento, através de eventos de transdução de sinal e do envolvimento de hormônios vegetais. Em nível molecular, estas respostas caracterizam-se por meio de mudanças no padrão

da expressão gênica. A resposta é iniciada quando a planta reconhece o estresse em nível celular e, a partir deste reconhecimento, moléculas sinalizadoras são ativadas em cascatas, as quais, por sua vez, transmitem a informação para o interior de células individuais e, em seguida, por toda a planta (BRAY et al., 2000). Uma resposta fisiológica específica ao estresse hídrico representa, na verdade, combinações de eventos moleculares que são ativados ou desativados pela percepção do estresse. Entender como os eventos interagem entre si será um passo importante no desenvolvimento de maior tolerância à seca (CASAGRANDE et al., 2001). Alguns dos genes induzidos são requeridos para a tolerância ao estresse e o acúmulo destes produtos gênicos pode se tornar uma resposta adaptativa. No entanto, é importante ressaltar que a expressão de determinados genes não necessariamente contribuirá para a sobrevivência da planta ao estresse, sendo simplesmente o resultado de estresses secundários e/ou de injúrias (BRAY, 2002).

3.3. Estudo da Expressão Gênica Dependente do Genótipo em Plantas sob Estresse Hídrico

Uma limitação de grande parte dos experimentos de expressão gênica é o uso de genótipos únicos, sem a comparação das diferenças em nível transcricional entre genótipos tolerantes e sensíveis à seca, quando submetidos às condições de estresse hídrico. Conseqüentemente fica impossível separar os genes relacionados à tolerância dos genes que são simplesmente responsivos à seca. Assim, muitos desses genes diferencialmente expressos identificados podem não ser responsáveis pelo aumento da tolerância (GUO et al., 2009). A identificação dos reguladores responsivos à seca em genótipos contrastantes em tolerância pode auxiliar na elucidação da interação em nível sistêmico entre diferentes vias genéticas que conferem a tolerância. Apesar de alguns genes envolvidos na resposta ao estresse hídrico já terem sido identificados, a maioria dos componentes-chaves da sinalização ao estresse, responsável pela tolerância dependente do genótipo permanece desconhecida. Portanto, o estudo comparativo do perfil de expressão gênica de genótipos tolerantes e sensíveis à seca possibilita a

identificação de novos genes e mecanismos reguladores com significado adaptativo evolutivo (LENKA et al., 2011).

A caracterização de genótipos tolerantes ou sensíveis à seca é um pré-requisito para a seleção e manipulação genética em culturas agronômicas de interesse. A identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância são cruciais para o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes ao estresse hídrico. A expressão diferencial de genes ainda não identificados em genótipos tolerantes pode ser usada para o estudo desses mecanismos. Dessa maneira, a biologia molecular assume papel-chave na identificação pontual de genes envolvidos nas respostas ao estresse hídrico, o que poderá permitir, por sua vez, a identificação e a compreensão das rotas metabólicas acionadas nas respostas fisiológicas à seca. No futuro, esses genes poderão ser utilizados, via engenharia genética, em genótipos de cana-de-açúcar altamente produtivos, mas, sensíveis à seca, assim como em espécies incompatíveis, no que se refere ao cruzamento, tais como outras gramíneas de grande importância agronômica. Outra possibilidade de aplicação desses genes seria utilizá-los como sondas moleculares em programas de melhoramento assistido, permitindo a seleção precoce de genótipos de interesse (CASAGRANDE et al., 2001).

A tolerância à seca é uma característica complexa, que parece envolver a alternância fisiológica e bioquímica coordenada em nível celular e molecular, através de modificações nos níveis de RNAs mensageiros (mRNAs) e de proteínas, levando assim a condição de tolerância (AMUDHA & BALASUBRAMANI, 2011). Através de algumas técnicas de biologia molecular é possível analisar os níveis de mRNAs, que codificam proteínas relacionadas e/ou responsáveis por quaisquer características que se pretenda estudar. O pressuposto é que se a quantidade de um mRNA específico está aumentada, reduzida ou mesmo indetectável, a quantidade e a atividade funcional da proteína na célula, naquela dada circunstância, segue o mesmo padrão de expressão que sua mensagem (mRNA). A modulação da expressão de uma proteína pode ocorrer em estágio posterior, no momento da tradução do mRNA ou após esse passo, mas de modo geral, os níveis de mRNA e da proteína específica seguem uma variação diretamente proporcional (REBOUÇAS & GOMES, 1999).

Diversas técnicas foram desenvolvidas para a identificação de genes diferencialmente expressos. No entanto, enquanto técnicas como a de *GeneChip* está frequentemente condicionada ao arranjo de sequências gênicas conhecidas, a técnica de cDNA-AFLP (*Complementary DNA-Amplified Fragment Length Polymorphism*) não requer informações prévias de sequências e é universal para quaisquer organismos e interações, sendo, portanto, uma ferramenta poderosa para a identificação de novos genes em organismos não-modelos (CARMONA et al., 2004; WANG et al., 2010). Neste contexto, a técnica de cDNA-AFLP pode auxiliar na identificação de genes envolvidos com o caráter de tolerância à seca em cana-de-açúcar, através da sua utilização para a análise comparativa de cultivares contrastantes para a tolerância, quando expostas ao estresse hídrico.

3.4. A Técnica de cDNA-AFLP

A técnica de cDNA-AFLP usa o protocolo padrão do AFLP em um molde de cDNA (JAYARAMAN et al., 2008). Conforme descrito por BACHEM et al. (1998), é uma técnica eficiente, sensível e reprodutível para a detecção de genes diferencialmente expressos. O cDNA-AFLP tem sido utilizado com sucesso na discriminação em larga escala de genes diferencialmente expressos em plantas (LESTARI et al., 2006).

Esta técnica 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. A tecnologia AFLP combina o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) com a tecnologia baseada na PCR por meio da ligação de sequências (adaptadores) reconhecidas por oligonucleotídeos (*primers*) aos cDNAs, que passaram por tratamento prévio com enzimas de restrição específicas. 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 das sequências é requerido.

Ao contrário de técnicas como *Differential Display* e RAPDs (DNAs polimórficos amplificados ao acaso) que usam *primers* arbitrários, podendo gerar resultados

incertos, a técnica de AFLP usa apenas dois *primers*, fornecendo resultados reprodutíveis e alta resolução devido às rigorosas condições (alta estringência) da PCR (APPLIED BIOSYSTEMS-PE, 1997). Além disso, o cDNA-AFLP possibilita a detecção de transcritos pouco abundantes, o que é difícil em outras técnicas para o estudo da expressão gênica como, por exemplo, na tecnologia de arranjos de cDNAs (KIVIOJA et al., 2005).

De acordo com BACHEM et al. (1998), para a realização da técnica de cDNA-AFLP são necessárias quatro etapas (Figura 1): (1) síntese do cDNA a partir do mRNA, usando oligonucleotídeo poli(dT); (2) produção do molde primário por meio da digestão dos cDNAs com enzimas de restrição e ligação de adaptadores específicos às extremidades dos fragmentos gerados, (3) amplificação pré-seletiva dos fragmentos de restrição por meio de oligonucleotídeos (*primers*) que se ligam às sequências dos adaptadores e do sítio de restrição e (4) amplificação seletiva dos fragmentos de restrição com os *primers* seletivos de AFLP disponíveis.

Após a etapa de síntese dos cDNAs a partir do RNA total, utilizando oligonucleotídeo poli(dT), a segunda etapa consiste na geração dos fragmentos de restrição com o auxílio de duas endonucleases, uma de corte raro (6-8 bases de reconhecimento) e outra de corte freqüente (4 bases de reconhecimento). O alto nível de especificidade dessas enzimas resulta na produção de um conjunto reprodutível de fragmentos de cDNAs (BACHEM et al., 1996; BLEARS et al., 1998). Com a reação de digestão, três tipos de fragmentos de restrição são gerados: fragmentos cortados pela enzima de corte raro nas duas extremidades; fragmentos cortados em ambas as extremidades pela enzima de corte freqüente; e fragmentos cortados em uma das extremidades pela enzima de corte raro e na outra pela enzima de corte freqüente. Dessa forma, usando as enzimas de restrição, *EcoRI* (corte raro) e *Msel* (corte freqüente), são produzidos fragmentos cortados, respectivamente, por *EcoRI-EcoRI*, *Msel-Msel* e *EcoRI-Msel* (BLEARS et al., 1998).

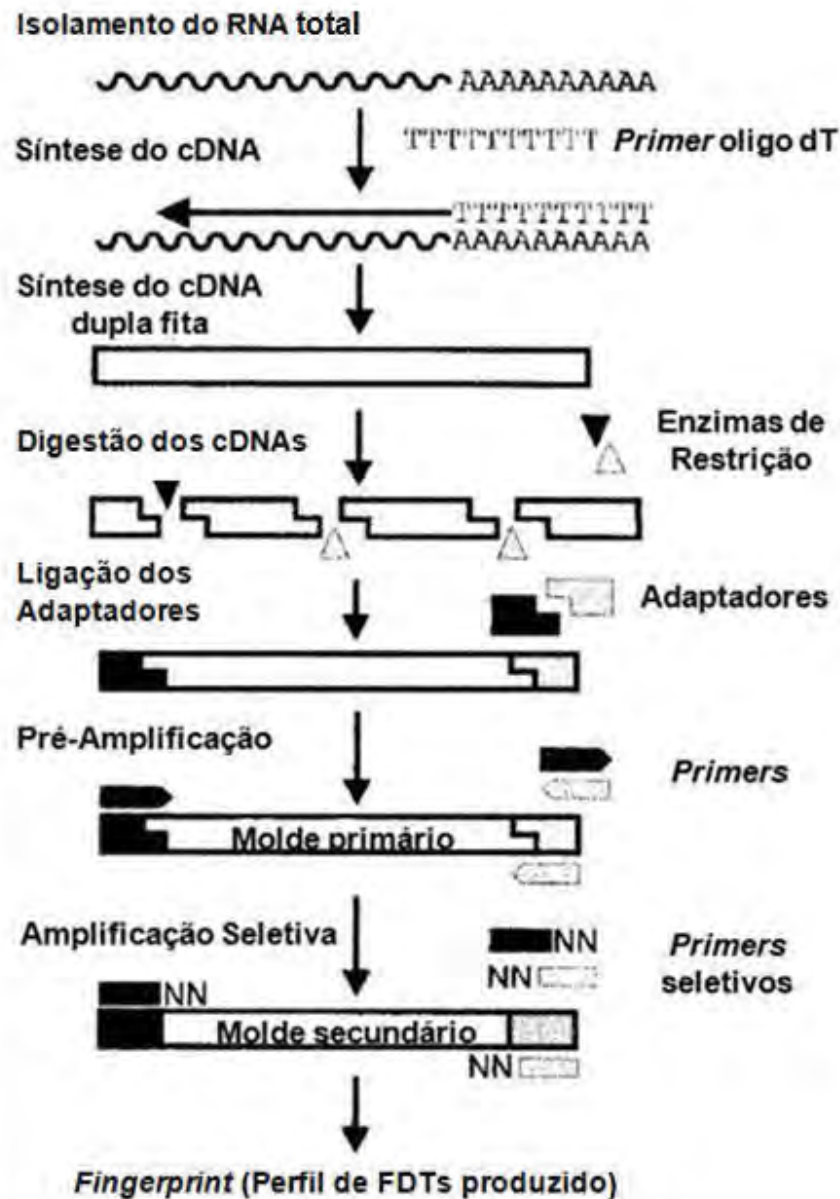


Figura 1. Esquema da metodologia de cDNA-AFLP. As etapas do procedimento estão marcadas a esquerda na figura e os componentes-chave são mostrados a direita. *Fingerprint* representa o padrão ou perfil resultante de FDTs (Fragments Derived of Transcript) (Modificado de BACHEM et al., 1998).

A técnica de cDNA-AFLP não depende do conhecimento prévio da sequência dos cDNAs. Os adaptadores, os quais são complementares às extremidades cortadas, são ligados aos fragmentos após a digestão e a sequência desses adaptadores e do

sítio de restrição adjacente servem como sítios de ligação para os *primers* das ampliações subseqüentes (BLEARS *et al.*, 1998). A primeira amplificação, chamada de pré-seletiva, representa a terceira etapa da técnica e utiliza *primers* que têm um ou nenhum nucleotídeo seletivo. Os produtos de PCR dessa pré-amplificação são diluídos e usados como moldes para uma segunda reação de amplificação, agora com um a três nucleotídeos seletivos, chamada de amplificação seletiva. A inclusão da pré-amplificação reduz os arrastos de fundo no padrão de bandas, causados por ampliações errôneas (DINIZ, 2007). Nesta reação, os fragmentos que possuem um adaptador em cada extremidade amplificam exponencialmente durante a amplificação por PCR. Dessa forma, a reação pré-seletiva efetivamente “purifica” as moléculas-alvo das demais sequências, que serão amplificadas apenas linearmente por apresentarem uma única extremidade modificada (APPLIED BIOSYSTEMS-PE, 1997).

Na quarta etapa, os *primers* para a amplificação seletiva contêm as seguintes sequências de nucleotídeos: na região 5', a sequência complementar ao adaptador, a sequência do sítio de restrição e os nucleotídeos seletivos na região 3'. Dois *primers* são usados: um complementar ao adaptador e a região de corte raro, com um a três nucleotídeos seletivos adicionais na região 3' e outro complementar ao adaptador e a região de corte frequente, com também um a três nucleotídeos seletivos adicionais na região 3'. Então após a ligação dos adaptadores, um número limitado de fragmentos é amplificado seletivamente sob condições de anelamento de alta estringência. Os fragmentos cortados por ambas as enzimas de corte raro e frequente (*EcoRI* e *MseI*) são preferencialmente amplificados por duas razões: (1) o *primer* complementar ao sítio de restrição de corte raro e ao adaptador possui uma temperatura de anelamento maior que o *primer* de corte frequente; (2) fragmentos cortados por ambas as enzimas são amplificados usando dois *primers* (*EcoRI* e *MseI*), evitando a formação de uma repetição invertida nas extremidades, cujo anelamento dos pares de bases formaria uma estrutura em alça, que impede o anelamento do *primer* (BLEARS *et al.*, 1998).

O *fingerprint*, ou seja, o padrão ou perfil resultante de bandas referentes aos FDTs (Fragments Derivados de Transcritos) pode ser analisado com base na presença ou ausência de banda e/ou pela intensidade diferencial das bandas entre as

amostras sob comparação. Os resultados são obtidos através da eletroforese em seqüenciador automático de DNA, com a subsequente utilização de programas apropriados para o processamento dos dados ou da eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, com posterior coloração com prata para a visualização das bandas. Esta última forma de análise é vantajosa, pois permite a recuperação dos FDTs a partir do gel de poliacrilamida reidratado, seguida da eluição dos fragmentos em tubo de PCR com água estéril ou tampão. Os fragmentos recuperados são então reamplificados com as mesmas combinações de *primers* que os produziram e os produtos da PCR purificados são caracterizados após a clonagem e seqüenciamento e/ou por seqüenciamento direto (BLEARS et al., 1998).

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal e Condução Experimental

O experimento com cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico foi realizado com duas cultivares tolerantes, SP83-5073 (EMBRAPA, 2007) e RB867515 (CRESTE et al., 2010; EMBRAPA, 2007; PMGCA, 2008) e uma cultivar sensível à seca, SP86-155 (GRAÇA et al., 2010); dois regimes hídricos (com e sem rega); quatro épocas de amostragem (após 1, 3, 5 e 10 dias de suspensão da rega) e quatro repetições biológicas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação situada no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/Unesp), no município de Jaboticabal – SP, com as seguintes coordenadas geográficas: latitude 21° 14' 39.62" Sul, longitude 48° 17' 59.00" Oeste e altitude de 609 metros.

A casa de vegetação (Modelo "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 dotada de cortina de sombreamento móvel no teto, bem como de sistema de resfriamento e umidificação e ventiladores para eliminação do ar quente. O experimento ocorreu durante os meses de setembro de 2008 a abril de 2009 e, durante este período, a temperatura média no interior da casa de vegetação foi de 27,39°C ± 2,31°C, com máxima de 31°C ± 2,38°C e mínima de 22,19°C ± 1,94°C e umidade relativa do ar com variação de 60,44 ± 17,44%.

Para a brotação das cultivares, os colmos, provenientes de soca de viveiro em bom estado fitossanitário, foram seccionados em mini-toletes (6,5 - 7,5 cm de comprimento) com apenas uma gema. Após o tratamento dos toletes com fungicida sistêmico Piori Xtra® (Syngenta) (25 mL do fungicida para cada 10 L de água), cerca de 14 a 16 mini-toletes foram distribuídos em bandejas de plástico (30 cm X 20 cm x 10 cm) contendo areia peneirada, com a qual foram completamente encobertos. A rega foi realizada diariamente ao longo da brotação e desenvolvimento das mudas.

Posteriormente, aos 35 DAP (dias após o plantio) para a cv SP83-5073, aos 36 DAP para a cv RB867515 e aos 24 DAP para a cv SP86-155, as mudas selecionadas com base no desenvolvimento da parte aérea e das raízes foram transplantadas para vasos de plástico de 14,5 dm³ (altura de 23 cm; menor e maior diâmetro, respectivamente, de 22,1 e 27,5 cm) (uma plântula por vaso), preenchidos com solo Argissolo Vermelho-Amarelo, previamente submetido à calagem e correção de nutrientes (Tabela 1). Este solo, coletado no município de Catanduva, é representativo da região Noroeste do Estado de São Paulo, atual região de expansão da cultura de cana-de-açúcar.

Tabela 1. Caracterização Físico-Química de Amostra de Argissolo Vermelho-Amarelo após Calagem e Correção de Nutrientes.

Caracterização Química ⁽¹⁾									
pH	M.O.*	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB*	T*	V*
em CaCl ₂	em g.dm ⁻³	(resina) mg.dm ⁻³	-----mmol _c .dm ⁻³ -----						%
5,7	12	68	10,0	24	15	15	49,0	64,0	77
		B	Cu	Fe	Mn	Zn	S-SO ₄	Al	
		-----mg.dm ⁻³ -----						mmol _c .dm ⁻³	
		0,40	0,6	8,0	14,0	0,9	0,0		
Caracterização Física ⁽¹⁾									
Argila		Limo		Areia		Classe			
				Fina	Grossa	Textural			
		-----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. ⁽¹⁾ Análise realizada no Laboratório de Análise de Solo e Planta, do Departamento de Solos e Adubos, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, Estado de São Paulo.

A calagem e correção de macro (N, P e K) e micronutrientes (cobre, zinco, ferro e boro) do solo foi realizada acrescentando a cada 500 L de solo seco e peneirado, 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). Ademais, quando as plantas estavam com cerca de cinco meses receberam adubação de cobertura, através da aplicação de solução aquosa de uréia 4% (2,0 g de uréia a cada 50 mL de água) sobre o solo de cada vaso.

Durante a condução experimental, a irrigação foi realizada por meio da rega manual, mantendo a umidade do solo na faixa de 65-75% da capacidade de campo (CC). O monitoramento da umidade do solo foi realizado no máximo a cada dois dias, utilizando um atmômetro de *Livingston*, que permite estimar a evapotranspiração (ET), através da variação do volume de água (ΔV_a) em milímetros (mm) do seu reservatório (BRONER & LAW, 1991; PORTO et al., 2000). A quantidade de água perdida (ET) pelo sistema solo/planta foi reposta utilizando a seguinte fórmula:

$$ET = \Delta V_a \times [A_{\varnothing_{\text{superior}}} \times 0,4 K_c]$$

ET = quantidade de água perdida por evapotranspiração (mL);

ΔV_a = variação do volume de água (mm) no atmômetro;

$A_{\varnothing_{\text{superior}}}$ = área do diâmetro superior do vaso (dm²);

K_c = coeficiente cultural utilizado foi de 40%.

Concomitantemente, a umidade foi monitorada através da pesagem ao acaso de alguns vasos para verificar se estavam dentro da faixa de peso calculada para umidade do solo entre 65-75% da CC. Considerando a densidade da água (d_a) como sendo igual a 1 ($d_a = 1,0 \text{ kg L}^{-1}$), a massa do conjunto “vaso+solo+planta+água” deveria ser mantida entre 18,49 Kg (65% CC) e 18,95 Kg (75% CC). Esta faixa de valores de massa do conjunto (Kg) inclui a massa do vaso vazio e do solo seco, do valor médio da massa fresca da planta (parte aérea + raízes) e a massa correspondente ao volume de água para 65 ou 75% da CC, respectivamente. Os métodos do atmômetro e da pesagem dos vasos foram utilizados simultaneamente para auxiliar no volume de água a ser repostado através da rega manual.

O tratamento de estresse hídrico iniciou-se quando as plantas estavam com seis meses, mais especificamente aos 186 dias após o plantio (DAP) da cv SP83-5073 e aos 175 DAP da cv RB867515 e da cv SP86-155. Considerando a divisão do ciclo da cana-de-açúcar nas seguintes fases fenológicas: brotação e emergência; perfilhamento;

crescimento dos colmos e maturação dos colmos (GASCHO & SHIH, 1983), o estresse hídrico por meio da suspensão da rega ocorreu entre o estágio de perfilhamento (109 DAP) e de desenvolvimento dos colmos (197 a 258 DAP) (ANDRÉ et al., 2010), ou seja, durante a fase formativa da cana, reconhecida como um período crítico por demanda de água, principalmente por ser a fase em que ocorre 70-80% da produção (SILVA et al., 2007). Portanto, é neste período que os danos provocados pela deficiência hídrica do solo são mais prejudiciais (PINCELLI et al., 2010). As épocas de amostragem (EAs) corresponderam às coletas das plantas após 1, 3, 5 e 10 dias de estresse hídrico. Para cada EA, foram conduzidas as plantas-controles mantidas em solo com disponibilidade hídrica adequada (65-75% CC), as quais foram coletadas juntamente com as plantas sob estresse hídrico.

A determinação da umidade do solo, na ocasião das coletas (EAs), referente aos dois regimes hídricos (com e sem rega), foi realizada através do cálculo do volume de poros do solo preenchido com água (Tabela 2). Para tanto, utilizou-se a média dos valores obtidos com a pesagem dos vasos das quatro repetições biológicas após a remoção da parte aérea das plantas, subtraindo o valor correspondente ao vaso vazio e à média do volume de raízes.

Tabela 2. ¹Volume de poros do solo preenchidos com água, expresso em percentagem.

² EA (dias)	Cv SP83-5073			Cv RB867515			Cv SP86-155		
	³ Controle	⁴ DH	⁵ DVP _a	Controle	DH	DVP _a	Controle	DH	DVP _a
1	70,97%	55,32%	15,65%	71,46%	60,63%	10,83%	69,96%	58,58%	11,38%
3	70,78%	47,13%	23,65%	66,23%	51,49%	14,74%	67,72%	52,61%	15,11%
5	70,04%	35,77%	34,27%	69,03%	42,91%	26,12%	65,86%	43,47%	22,39%
10	69,11%	19,40%	49,71%	70,34%	22,20%	48,14%	65,67%	24,25%	41,42%

⁽¹⁾ Derivado de cálculo utilizando o valor médio obtido das pesagens do solo das quatro repetições biológicas; ⁽²⁾EA: Épocas de Amostragem; ⁽³⁾Controle: Solo com adequado suprimento hídrico (com rega); ⁽⁴⁾DH: Solo com deficiência hídrica (supressão da rega); ⁽⁵⁾DVP_a: diferença do volume de poros do solo preenchidos com água entre os dois regimes hídricos, ou seja, DVP_a = solo_{controle} – solo_{DH}.

4.2. Coleta da Folha+1 da Cana-de-Açúcar

A área foliar é um importante fator da produção e determina o uso da água pelas plantas. O seu potencial de produtividade é severamente inibido quando exposta ao

estresse hídrico. A resposta mais proeminente das plantas a deficiência hídrica consiste no decréscimo da produção da área foliar, do fechamento dos estômatos, da aceleração da senescência e da abscisão das folhas. A limitação na área foliar pode ser considerada como a primeira reação das plantas em relação à deficiência de água (SANTOS & CARLESSO, 1998). Se uma folha não recuperar sua turgidez rapidamente após o fechamento dos estômatos, ela murcha, morre e cai. Sob uma condição de severa deficiência de água, uma planta pode perder todas as suas folhas exceto aquelas próximas aos ápices dos ramos (SUTCLIFFE, 1980).

Tendo em vista tais considerações, o presente trabalho foi realizado utilizando a folha+1 da cana-de-açúcar, que corresponde, conforme o sistema de Kuijper (DILLEWIJN, 1952), à primeira folha da haste com aurícula (colarinho) visível ou folha TVD (*Top Visible Dewlap*). A escolha da folha+1 se deve a necessidade de padronização na avaliação e esta folha é adotada em muitos estudos, tal como de diagnose foliar e de análise da expressão gênica. Portanto, em cada EA foi coletada a folha+1 que, após a retirada da nervura central, foi rapidamente dividida em pedaços menores com o uso de estilete, envolvida em papel alumínio, transferida para o N₂ líquido e posteriormente armazenada em *ultrafreezer* a – 80°C até o momento da utilização.

4.3. Extração do RNA total

Antes de iniciar a extração do RNA total, os utensílios (almofariz, pistilo e espátulas) foram mantidos a 180°C por 2 h, de forma a impedir a ação de RNAses. A extração foi realizada com 60 mg de *pool* composto por 15 mg de tecido foliar de cada uma das quatro repetições biológicas, utilizando o *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare), conforme descrito abaixo.

- **Homogeneização da Amostra**

- Foi homogeneizado 60 mg de tecido foliar (folha+1), até a formação de um pó fino, por meio da maceração em N₂ líquido, utilizando almofariz (gral) e pistilo de porcelana;

- **Lise Celular**

- Foram adicionados 350 μL de tampão RA1 do *kit* e 3,5 μL de β -mercaptoetanol ao tecido macerado e agitou-se vigorosamente por meio de vórtex;

- **Filtração dos Resíduos Celulares**

- Os resíduos celulares resultantes da reação de lise foram aplicados em um minifiltro RNAspin inserido em tubo coletor e filtrado por meio de centrifugação por 1 min a 11.000 X g;

- O filtrado foi transferido com cuidado para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, para evitar a transferência do material precipitado;

- **Ajuste das Condições para a Ligação do RNA**

- Foram adicionados 350 μL de etanol 70% ao filtrado e misturou-se por 5 s com vórtex, por duas vezes;

- **Ligação do RNA**

- Para cada preparação, foi colocada uma minicoluna RNAspin dentro de um tubo de microcentrífuga de 2,0 mL e então pipetou-se o lisado, subindo-o e descendo-o na ponta por 2-3 vezes antes de colocá-lo dentro da coluna. Centrifugou-se por 30 s a 8.000 X g;

- **Dessalinização da Membrana de Sílica**

- Adicionou-se 350 μL de tampão de dessalinização da membrana (MDB) do *kit* e centrifugou-se a 11.000 X g por 1 min para a secagem da membrana. Descartou-se o sobrenadante e a coluna foi novamente inserida no tubo coletor. A remoção do sal torna mais eficaz a digestão do DNA com a enzima DNase I;

- **Digestão do DNA**

- O tampão de reação da enzima DNase I foi previamente preparado em tubo de microcentrífuga estéril. Para cada isolamento, adicionou-se 10 μL da DNase a 90 μL do tampão de reação. Misturou-se por meio de suaves inversões do tubo. Aplicou-se 95 μL da mistura da reação contendo a DNase I diretamente no centro da membrana de sílica da coluna. Incubou-se a temperatura ambiente por 15 min;

- **Lavagem e Secagem da Membrana de Sílica**

- **1ª Lavagem:** adicionou-se 200 μ L de tampão RA2 do *kit* à minicoluna RNAspin, o qual inativa a enzima DNase I. Centrifugou-se por 1 min a 11.000 X g;
- **2ª Lavagem:** adicionou-se 600 μ L do tampão RA3 do *kit* à minicoluna RNAspin. Centrifugou-se por 1 min a 11.000 X g. Descartou-se o sobrenadante e a minicoluna foi novamente colocada no tubo coletor;
- **3ª Lavagem:** adicionou-se 250 μ L do tampão RA3 do *kit* à minicoluna RNAspin. Centrifugou-se a 11.000 X g por 2 min para secar completamente a membrana. A coluna foi inserida em novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL livre de nuclease;
- **Eluição de RNA total de Alta Pureza**
 - O RNA total foi eluído em 100 μ L de água livre de RNase do *kit* através da centrifugação a 11.000 X g por 1 min e então estocado em *ultrafreezer* a - 80°C até a utilização.

4.3.1. Quantificação do RNA total

A concentração e o grau de pureza do RNA total foram determinados através da leitura em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 UV/VIS (*Thermo Fisher Scientific, USA*), nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm. A relação entre as leituras 260/280 nm e 260/230 nm fornece uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos e soluções que apresentem relação $A_{260}/A_{280} \text{ nm} \geq 1,80$ e $A_{260}/A_{230} \text{ nm} = 2,00$ são consideradas de boa qualidade. Uma relação abaixo destes valores indica a presença de contaminantes que absorvam a 280 nm, tal como proteínas ou a 230 nm como tiocianato de guanidina (SAMBROOK et al., 1989).

4.3.2. Análise da Integridade do RNA total

Para verificar a integridade das amostras por meio da presença das bandas dos RNAs ribossomais 18 S e 28 S (SAMBROOK et al., 1989), 1,0 μ g do RNA total foi adicionado a 18 μ L da mistura composta por 15 μ L de tampão de amostra (750 μ L de formamida; 150 μ L de tampão de corrida 10x; 90 μ L de formaldeído; quantidade mínima de bromofenol e água-DEPC em q.s.p. 1,125 mL), 0,5 μ L de brometo de etídeo (10 mg/mL) e 2,5 μ L de água-DEPC. O RNA total foi então aquecido em banho-maria a

65°C por 7 min antes da aplicação em gel desnaturante de agarose a 1,5% (p/v), contendo 6,7% de formaldeído (v/v). O gel foi submetido à eletroforese a 60 V constante, por cerca de 50 min e, em seguida, exposto à luz ultravioleta (UV) em transiluminador para a visualização das bandas dos RNAs ribossomais. A imagem do gel foi captada por uma câmara CCD (*Eastman Kodak Company*, USA).

4.4. Síntese dos cDNAs Dupla-Fita

A síntese da primeira fita dos cDNAs foi realizada a partir de 1,0 µg do RNA total, utilizando o *Revertaid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Fermentas*, Lituânia) e a segunda fita foi sintetizada conforme as orientações do fabricante.

4.4.1. Procedimento para a Síntese da 1ª Fita dos cDNAs

- Para cada amostra, uma alíquota contendo 1,0 µg do RNA total foi preparada em tubo estéril e livre de nucleases, com a adição de água DEPC em q.s.p. 11 µL;
- A seguir, os reagentes do *kit* foram adicionados ao tubo, na ordem descrita abaixo, atingindo o volume final de 20 µL:
 - 1,0 µL de *primer* oligo(dT)₁₈;
 - 4,0 µL de 5X tampão de reação;
 - 20 U de *RiboLock™*, o qual é um inibidor de RNase;
 - 2,0 µL de *mix* de dNTP a 10 mM; e
 - 200 U da enzima *RevertAid™ H Minus M-MuLV Transcriptase Reverse*.
- Misturou-se cuidadosamente e centrifugou-se rapidamente (*spin*) em microcentrífuga;
- Incubou-se por 60 min a 42°C;
- A reação foi interrompida por meio do aquecimento a 70°C por 5 min, para a inativação enzimática.

4.4.2. Procedimento para a Síntese da 2ª Fita dos cDNAs

- Adicionou-se os seguintes reagentes aos 20 µL da reação de síntese da primeira fita dos cDNAs:

- 8,0 μ L de 10X tampão de reação da DNA Polimerase I (*Fermentas*, Lituânia);
- 1,0 U da enzima RNase H, *E. coli* (Invitrogen Corp., CA, USA);
- 30 U da enzima DNA Polimerase I, *E. coli* (*Fermentas*, Lituânia);
- Adicionou-se água livre de nuclease em q.s.p. 100 μ L.
- Incubou-se a 15°C por 2 h;
- Adicionou-se 12,5 U da enzima T4 DNA Polimerase (*Fermentas*, Lituânia), seguida da incubação a 15°C por 5 min;
- A reação foi interrompida por meio da adição de 5,0 μ L de 0,5 M de EDTA, pH 8,0;
- Os cDNAs dupla-fita foram purificados utilizando o método fenol-clorofórmio.

4.4.3. Purificação dos cDNAs utilizando o Método Fenol-Clorofórmio

- **Extração dos cDNAs**

- Adicionou-se água Milli-Q autoclavada ao volume de 100 μ L da reação de síntese dos cDNAs dupla-fita, em q.s.p. 500 μ L;
- Adicionou-se 500 μ L da mistura de fenol pH 8,0, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, respectivamente;
- Centrifugou-se a 2.300 X g a 4°C por 5 min;
- A fase aquosa foi transferida para novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e então foi acrescentado 500 μ L de clorofórmio;
- Centrifugou-se a 2.300 X g a 4°C por 5 min;
- Os dois últimos passos foram repetidos novamente.

- **Precipitação dos cDNAs**

- Transferiu-se a fase aquosa para novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e adicionou-se 50 μ L de 3,0 M acetato de sódio, pH 5,2 e 500 μ L de isopropanol gelado;
- Centrifugou-se a 16.100 X g a 4°C por 30 min;
- O material foi mantido *overnight* em *freezer* a - 20°C;

- **Lavagem dos cDNAs**

- Centrifugou-se a 12.000 X g por 10 min;

- Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* (cDNAs precipitados) foi lavado com 500 μ L de etanol 70% gelado para a remoção dos sais residuais;

- Os dois passos acima foram novamente realizados.

- **Secagem dos cDNAs**

- O *pellet* ficou a temperatura ambiente por 1 h para a evaporação do etanol residual e então foi colocado em solução utilizando 15,5 μ L de água Milli-Q autoclavada;

- Os cDNAs foram quantificados e avaliados quanto a pureza em espectrofotômetro e, em seguida, armazenados em *ultrafreezer* a - 80°C até a utilização.

4.5. Técnica de cDNA-AFLP

O cDNA-AFLP foi realizado com uma repetição técnica. De acordo com os estudos realizados por WANG et al. (2009), os padrões de banda obtidos através da técnica são altamente reprodutíveis quando comparados aos de outras técnicas semelhantes, tal como o *Differential Display*. Além disso, apesar da análise de cDNA-AFLP ser simples e rápida para o estudo da expressão gênica, um grande experimento de cDNA-AFLP pode requerer uma significativa quantidade de recursos, tais como inúmeras ampliações por PCR e corridas de gel de eletroforese, seguidas do corte manual de um amplo número de bandas dos géis (KIVIOJA et al., 2005).

Para a realização das reações que compõem o cDNA-AFLP foi utilizado o *Regular Plant Genome Kit Modules (Applied Biosystems-PE, Inc., CA, USA)*, seguindo as instruções do fabricante mas, com algumas modificações.

4.5.1. Reação de Restrição

Nesta etapa os cDNAs passam por digestão utilizando as enzimas de restrição, *EcoRI* (corte raro) e *MseI* (corte frequente) (Tabela 3), que geram fragmentos com extremidades compatíveis para a ligação subsequente dos adaptadores *EcoRI* e *MseI*. Na reação de restrição foram utilizados:

- 200 ng dos cDNAs dupla-fita;
- 5,0 U da enzima *EcoRI* (*Fermentas*, Lituânia);
- 0,5 U da enzima *MseI* (*Invitrogen Corp.*, CA, USA);

- 1,25 µL de 10X tampão *React 1* (*Invitrogen Corp.*, CA, USA); e
- 2,5 µL de água Milli-Q autoclavada.

Tabela 3. Sítio de Reconhecimento das Enzimas de Restrição. Destaque em amarelo do nucleotídeo alterado na sequência dos adaptadores.

<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>
5' - G [↓] AATTC - 3'	5' - T [↓] TAA - 3'
3' - CTTAA [↑] G - 5'	3' - AAT [↑] T - 5'

A reação ocorreu por meio da incubação em termociclador a 37°C por 2 h e, em seguida, foi submetida a 70°C por 15 min para a inativação das enzimas de restrição.

4.5.2. Reação de Ligação

Os adaptadores possuem sequências complementares às pontas coesivas geradas pelas enzimas *EcoRI* e *MseI*, mas com a alteração de um nucleotídeo (Figuras 1 e 2) para impedir a restauração do sítio de restrição (BLEARS et al., 1998). Tais adaptadores servem como sítios de ligação para os *primers* utilizados na amplificação subsequente (Figura 3).

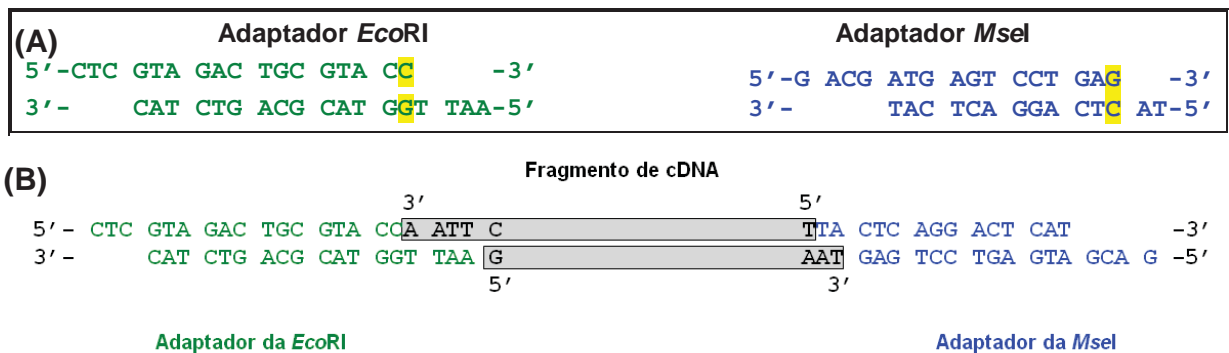


Figura 2. Esquema ilustrando a ligação dos adaptadores nas extremidades dos fragmentos de restrição. (A) Sequência de nucleotídeos dos adaptadores *EcoRI* e *MseI*. Os sítios de reconhecimento *EcoRI* e *MseI* não são restaurados pela ligação dos adaptadores porque há uma mudança de base (nucleotídeo destacado em amarelo) em sua sequência. (B) Após a digestão dos cDNAs com as enzimas *EcoRI* e *MseI*, os adaptadores dupla-fita, complementares às pequenas extensões fita-simples geradas pelas enzimas de restrição, são ligados aos fragmentos de cDNAs.

Uma alíquota com 0,33 μL de cada um dos adaptadores *EcoRI* e *MseI* do *kit* foi, separadamente, aquecida a 95°C por 5 min e resfriada a temperatura ambiente por 10 min. Os dois adaptadores foram adicionados em tubos contendo, separadamente, 3,7 μL de cada amostra dos cDNAs digeridos e então acrescentou-se:

- 0,5 μL de 10X tampão da enzima T4 DNA ligase (*New England Biolabs, Inc.*); e
- 80 U (*Weiss units*) da enzima T4 DNA ligase (*New England Biolabs, Inc.*).

A reação de ligação foi mantida a 20°C por 2 h em termociclador e, em seguida, foi diluída em 3X tampão TE (10 mM de Tris-HCl e 1,0 mM de EDTA, pH 8,0).

4.5.3. Reação de Amplificação Pré-Seletiva

Para a amplificação dos fragmentos de cDNAs foram utilizados os *primers* pré-seletivos *EcoRI* e *MseI*. O *primer EcoRI* é formado pelo sítio de reconhecimento (SR) do adaptador + SR da região de corte da enzima de restrição + nucleotídeo Adenina (A) e o *primer MseI* é formado pelo SR do adaptador + SR da região de corte da enzima de restrição + nucleotídeo Citosina (C) (Tabela 4).

Tabela 4. *Primers* da Reação de Amplificação Pré-Seletiva.

<i>Primer EcoRI</i>	<i>Primer MseI</i>
5' - GAC TGC GTA CCA ATT CA -3'	5' - G ATG AGT CCT GAG TAA C -3'

SR do Adaptador (azul) + do Sítio de Restrição (vermelho) + nucleotídeo A (*EcoRI*) e C (*MseI*).

Nesta etapa, com o anelamento dos *primers EcoRI* e *MseI* (Figura 3), os fragmentos de cDNAs, contendo os adaptadores ligados nas duas extremidades amplificam exponencialmente na PCR, predominando no produto final. Na reação foram utilizados:

- 4,0 μL da reação anterior diluída 3X;
- 1,0 μL do *mix* contendo os *primers* pré-seletivos (*EcoRI* e *MseI*) do *kit*; e
- 15 μL do *AFLP Amplification Core Mix* (contendo tampão, dNTPs, MgCl_2 e a enzima DNA polimerase) do *kit*.

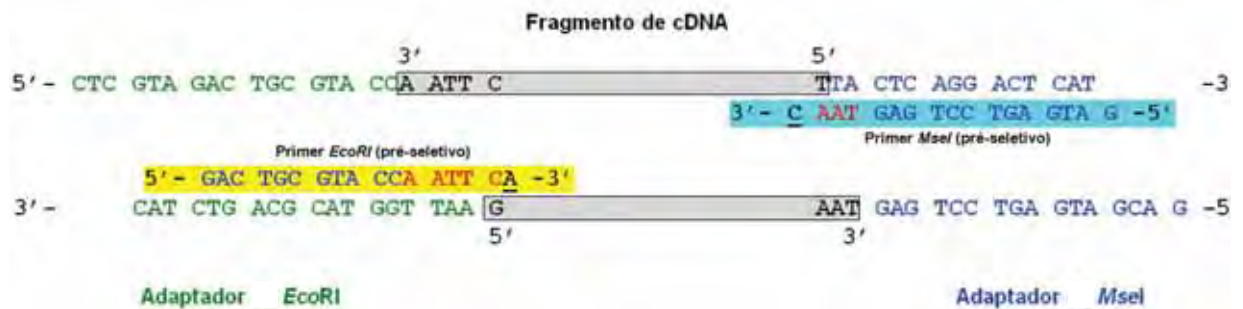


Figura 3. Anelamento dos *primers EcoRI* e *MseI* durante a Reação Pré-Seletiva.

As amostras foram amplificadas em termociclador de acordo com os parâmetros a seguir e após o término da PCR, as amostras foram diluídas 4x em tampão TE (10 mM de Tris-HCl e 1,0 mM de EDTA, pH 8,0).

Início	20 Ciclos			Término
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	
72°C 2 min	94°C 20 s	56°C 30 s	72°C 2 min	60°C 30 min

4.5.4. Determinação das Combinações de *Primers* para a Reação Seletiva

O *kit* utilizado possibilita 64 combinações de *primers EcoRI* e *MseI*. Os *primers EcoRI* são marcados na extremidade 5' com composto fluorescente de cor amarela (NED) ou azul (FAM) ou verde (JOE), permitindo a detecção dos fragmentos em sequenciador automático de DNA. Para a determinação das combinações de *primers EcoRI/MseI* que permitem detectar maior número de FDTs diferencialmente expressos entre as cultivares de cana-de-açúcar tolerantes e sensível, foram testadas 24 combinações (Tabela 5) escolhidas ao acaso. Nesta análise, amostras das três cultivares, referentes à quarta época de amostragem (4^a EA) foram utilizadas, sendo a escolha da EA aleatória. Dessa forma, contabilizou-se o número total de FDTs, correspondentes a uma banda presente nas amostras de quaisquer das cultivares tolerantes sob estresse hídrico desde que ausente na amostra correspondente da cultivar sensível, ou seja, foi realizada uma análise qualitativa.

Tabela 5. As 24 Combinações de *primers* seletivos previamente testadas.

Combinação de <i>Primers EcoRI/Msel</i>
<u>A</u>CA/<u>C</u>AG
<u>A</u>CA/<u>C</u>TC
<u>A</u>CA/<u>C</u>TG
<u>A</u>CT/<u>C</u>AA
<u>A</u>CT/<u>C</u>AG
<u>A</u>CT/<u>C</u>TG
<u>A</u>CT/<u>C</u>TT
<u>A</u>AG/<u>C</u>AT
<u>A</u>AG/<u>C</u>TA
<u>A</u>AG/<u>C</u>TC
<u>A</u>AG/<u>C</u>AG
<u>A</u>AG/<u>C</u>TT
<u>A</u>CG/<u>C</u>TG
<u>A</u>CG/<u>C</u>AA
<u>A</u>CG/<u>C</u>AC
<u>A</u>GG/<u>C</u>AT
<u>A</u>AC/<u>C</u>TG
<u>A</u>CC/<u>C</u>AA
<u>A</u>CC/<u>C</u>AG
<u>A</u>CC/<u>C</u>AT
<u>A</u>CC/<u>C</u>TG
<u>A</u>CC/<u>C</u>TT
<u>A</u>GC/<u>C</u>AT
<u>A</u>GC/<u>C</u>TC

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

4.5.5. Reação de Amplificação Seletiva

Após a determinação das melhores combinações de *primers EcoRI/Msel*, 14 combinações (Tabela 6) foram selecionadas para a realização das reações de amplificação seletiva, desta vez, utilizando todas as 24 amostras referentes as três cultivares, aos dois regimes hídricos e as quatro EAs.

Tabela 6. As 14 combinações de *primers* seletivos utilizadas na técnica de cDNA-AFLP.

Combinação de <i>Primers EcoRI/MseI</i>
<u>A</u> CA / <u>C</u> AG
<u>A</u> CT / <u>C</u> AA
<u>A</u> CT / <u>C</u> AG
<u>A</u> CT / <u>C</u> TG
<u>A</u> CT / <u>C</u> TT
<u>A</u> AG / <u>C</u> TC
<u>A</u> AG / <u>C</u> AG
<u>A</u> CG / <u>C</u> TG
<u>A</u> CG / <u>C</u> AA
<u>A</u> GG / <u>C</u> AT
<u>A</u> AC / <u>C</u> TG
<u>A</u> CC / <u>C</u> AT
<u>A</u> CC / <u>C</u> TG
<u>A</u> GC / <u>C</u> TC

Esta amplificação por PCR reduz a complexidade da mistura que poderá ser detectada em uma matriz através da eletroforese em seqüenciador automático de DNA e/ou da eletroforese em gel de poliacrilamida. Na reação de PCR seletiva com os *primers EcoRI* e *MseI* são amplificados fundamentalmente os fragmentos com os adaptadores *EcoRI* e *MseI* em suas extremidades (amplificação exponencial).

Em cada reação de amplificação seletiva, foram utilizados 3,0 µL dos produtos da reação de amplificação pré-seletiva diluída e os seguintes reagentes do *kit*:

- 1,0 µL do *primer MseI* a 5 µM (*Primer-Cxx*);
- 1,0 µL do *primer EcoRI* a 1 µM (*Primer-Axx* marcado por fluorescência); e
- 15 µL do *AFLP Amplification Core Mix*.

A PCR seletiva consistiu de 40 ciclos, incluindo 10 ciclos *touchdown* com uma redução gradual da temperatura de anelamento de 66°C para 56°C em 1°C por passo, mantendo a 56°C por 30 ciclos, conforme os parâmetros descritos abaixo:

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

4.6. cDNA-AFLP em Sequenciador Automático de DNA

Os produtos resultantes da amplificação seletiva foram analisados por meio da eletroforese capilar em seqüenciador automático de DNA *Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer* (*Applied Biosystems- PE, Inc., CA, USA*). Para cada amostra, preparou-se uma mistura contendo 8,0 µL de formamida deionizada e 0,37 µL do padrão interno de tamanho molecular *GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard* a 8,0 ηM (*Applied Biosystems- PE, Inc., CA, USA*), que foi utilizada juntamente com 1,5 µL dos produtos da reação seletiva. As amostras foram então submetidas ao aquecimento em termociclador a 95°C por 5 min para a desnaturação antes da corrida eletroforética.

O padrão de tamanho molecular *GeneScan-500 ROX*, utilizado em eletroforese de DNA baseada em fluorescência, possibilita a determinação do tamanho de fragmentos de DNA de 35 a 500 pares de bases (pb). Este padrão é marcado por composto fluorescente de cor vermelha e apresenta 16 padrões de fragmentos: 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500 bases. Portanto, nessa análise foram detectados e considerados os fragmentos com tamanho molecular entre 50 e 500 pares de bases.

Os dados resultantes da corrida das amostras no seqüenciador automático foram analisados com o auxílio do programa *GeneMapper® Software v 4.0* (*Applied Biosystems - PE, Inc., CA, USA*), que coleta os dados referentes à migração dos fragmentos amplificados no gel de eletroforese, gerando eletroferogramas e arquivos de texto binários determinando a presença (1) e a ausência (0) de banda (denominada pelo programa como “alelo”) de acordo com a intensidade de sinal do pico referente ao fragmento. Convencionou-se, como limiar de detecção do pico de um dado fragmento, a intensidade de sinal igual ou maior a 100. Assim, os fragmentos que apresentaram intensidade de sinal ≥ 100 foram determinados automaticamente pelo programa como uma banda (“alelo”). Tais arquivos de texto foram exportados para o *Excel*, gerando uma planilha binária. A partir desta planilha, realizou-se a análise visual não automatizada dos resultados, considerando como banda de FDT diferencialmente expresso entre as cultivares tolerantes e sensível, àquela presente em amostra da cana tolerante sob estresse hídrico desde que ausente na amostra correspondente da cana sensível (análise qualitativa). O cDNA-AFLP foi realizado em sequenciador automático de DNA para determinar a percentagem dos FDTs diferencialmente expressos entre os genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para a tolerância à seca que foi expressa exclusivamente na condição de estresse hídrico, ou seja, que não foi expressa nas cultivares tolerantes sob adequado suprimento hídrico (plantas-controles).

4.7. cDNA-AFLP em Eletroforese Vertical com Gel de Poliacrilamida 6%

- **Reação de Amplificação Seletiva com Modificações**

O cDNA-AFLP em eletroforese capilar no sequenciador automático de DNA (*Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer*) não permite a recuperação dos FDTs, portanto, uma nova análise de cDNA-AFLP foi realizada em eletroforese vertical com gel de poliacrilamida 6% (p/v) desnaturante para a excisão das bandas diferencialmente expressas entre os genótipos de cana-de-açúcar contrastantes. As reações de amplificação seletiva utilizando as 14 combinações de *primers* selecionadas foram padronizadas para permitir a boa visualização dos FDTs no gel de poliacrilamida corado com prata.

Nesta reação de amplificação seletiva foram utilizadas somente as amostras referentes as três cultivares de cana-de-açúcar sob supressão da rega, ou seja, não foram utilizadas as respectivas plantas-controles, pois o objetivo deste trabalho foi determinar os transcritos diferencialmente expressos entre genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para a tolerância quando expostos ao estresse hídrico. Para a reação seletiva, foram utilizados 2,0 μ L dos produtos da reação de amplificação pré-seletiva diluída 4X em tampão TE (10 mM de Tris-HCl e 1,0 mM de EDTA, pH 8,0) e então adicionou-se:

- 1,5 μ L de 10X tampão (200 mM de Tris-HCl, pH 8.4; 500 mM de KCl);
- 1,2 μ L de $MgCl_2$ a 25 mM;
- 1,5 μ L de dNTPs a 2,5 mM (*Invitrogen Corp.*, CA, USA);
- 2,0 μ L do *primer Msel* a 10 μ M sem marcação fluorescente (*Sigma Life Science*);
- 2,0 μ L do *primer EcoRI* a 10 μ M sem marcação fluorescente (*Sigma Life Science*);
- 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (*Fermentas*, Lituânia); e
- Água Milli-Q autoclavada q.s.p. 15 μ L.

A amplificação seletiva ocorreu em termociclador de acordo com os mesmos parâmetros citados no item 4.5.5 e 4,0 μ L dos produtos da PCR preparados com tampão de desnaturação na razão de 1:0,5 (produto: tampão) foram aplicados, após a desnaturação das amostras, em gel de poliacrilamida 6% contendo uréia 7,0 M. Após a eletroforese, os géis foram submetidos à coloração com prata, possibilitando a visualização dos três tipos de fragmentos: *EcoRI-EcoRI*; *Msel-Msel* e *EcoRI/Msel*; entretanto, a técnica de cDNA-AFLP favorece a amplificação exponencial dos fragmentos *EcoRI/Msel*. As eletroforeses e a coloração dos géis de poliacrilamida foram realizadas no Centro de Cana-de-Açúcar - IAC/RP com a colaboração e a orientação das pesquisadoras Dra. Luciana Rossini Pinto e Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza e o auxílio técnico do respectivo grupo de pesquisa, que possui grande experiência em AFLP.

A preparação das placas e das amostras, a corrida eletroforética e a coloração com prata foram realizadas conforme CRESTE et al. (2001) e estão descritas a seguir em maiores detalhes:

- **Montagem do Gel de Eletroforese**

- As placas de vidro foram limpas e desengorduradas, respectivamente, através da utilização de álcool e acetona;
- O tratamento das placas maiores de vidro - *Bind* (33,3 x 41,9 cm) se deu por meio da aplicação de 4,0 µL de γ -methacryloxypropyl- trimethoxysilane (*PlusOne Bind Silane*) (*Amersham Pharmacia Biotech.*) em 1,0 mL da solução composta por 5% de ácido acético glacial em 95% de etanol absoluto, espalhado cuidadosamente na placa para a ligação covalente do gel. Aguardou-se a secagem por 5 min;
- O tratamento das placas menores de vidro - *Repel* (33,3 x 39,4 cm) foi realizado por meio da aplicação de 1,0 mL da solução 2% de dimethyldichlorosilane em octamethyl cyclo-octasilane (*PlusOne Repel-Silane ES*) (*Amersham Pharmacia Biotech.*) para assegurar a posterior liberação do gel. Aguardou-se 5 min para a secagem;
- Preparou-se a solução 30% de acrilamida (29 g de acrilamida e 1,0 g de bis-acrilamida em 100 mL de água Milli-Q);
- A preparação da solução de uréia/acrilamida foi realizada por meio da adição de 100 mL da solução 30% de acrilamida; 100 mL de 5X TBE (445 mM de Tris-base; 445 mM de ácido bórico; 10 mM de EDTA) e 210 g de uréia. Por fim, adicionou-se água Milli-Q para o volume final de 500 mL, seguida da filtração e armazenamento a 4°C em frasco protegido da luz;
- As placas foram unidas, utilizando entre elas espaçador de 0,4 mm e colocando as partes tratadas internamente. Após lacrar as laterais das placas com fita adesiva, o aparato foi preenchido com a solução do gel (70 mL da solução uréia/acrilamida; 750 µL de 10% persulfato de amônio e 45 µL de TEMED). Após a aplicação do gel, o “pente” foi inserido de forma invertida na parte superior da placa, para a formação de uma grande canaleta e então, aguardou-se 1 h para a polimerização;
- O pente foi removido e a limpeza da canaleta se deu com uma pipeta, para retirar completamente os resíduos de uréia e de gel. A “pré-corrída” foi realizada em 1X

tampão TBE (89 mM de Tris-base; 89 mM de ácido bórico; 2,0 mM de EDTA) a 60 W para o aquecimento do gel até 55°C;

- **Preparo das Amostras (Produtos da Reação Seletiva)**

- Os produtos da reação de amplificação seletiva e os marcadores de tamanho molecular foram preparados por meio da adição de 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: tampão de desnaturação).
- A desnaturação dos produtos de PCR e dos marcadores foi realizada em termociclador a 95°C por 5 min e imediatamente colocados no gelo até a aplicação no gel;
- O “pente” foi inserido, desta vez para a formação de canaletas individualizadas e, em seguida, alíquotas de 4,0 µL de cada amostra (produtos da reação seletiva) e dos marcadores de tamanho molecular de 10 pb DNA *Ladder* (*Invitrogen Corp.*, CA, USA), de *O’ RangeRuler™* 20 pb DNA *Ladder* (*Fermentas*, Lituânia) e de *O’ RangeRuler™* 50 pb DNA *Ladder* (*Fermentas*, Lituânia) foram aplicadas no gel;
- A eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6% (p/v) em condições desnaturantes (7,0 M de uréia) foi realizada em 1X tampão TBE a 55 W por 120-150 min a 50-55°C.

- **Coloração com Prata**

Após a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida foi corado conforme descrito a seguir, sob agitação moderada em *shaker*.

- Desmontou-se, cuidadosamente, o dispositivo de eletroforese, separando as placas de vidro;
- Colocou-se a placa de vidro contendo o gel (*Placa Bind*) em uma bandeja plástica;
- Adicionou-se 1000 mL de solução fixadora (etanol 10% e ácido acético 1%), seguida de agitação por 10 min;
- Descartou-se a solução fixadora e procedeu-se a lavagem do gel com água destilada por 1 min;
- Pré-tratamento do gel (oxidação) com 1000 mL de ácido nítrico 1,5% sob agitação por 3 min;
- Lavagem do gel com 1000 mL de água destilada sob agitação por 2 min;

- Impregnação do gel com 1000 mL de solução de nitrato de prata (AgNO_3) 0,2% sob agitação por 20 min;
- Duas lavagens do gel com 1000 mL de água destilada sob agitação por 30 s;
- Revelação do gel por meio da adição de 250 mL de solução reveladora gelada (30 g/L de Na_2CO_3 e 0,54 mL de formaldeído 37%) e agitação manual da bandeja até a solução escurecer;
- Descartou-se a solução escurecida e os 750 mL restantes da solução reveladora gelada foram adicionados, seguido por agitação manual por 4-7 min até o aparecimento das bandas com a intensidade desejada;
- Removeu-se a solução e realizou-se o bloqueio da reação de revelação por meio da adição de 1000 mL de ácido acético 5% com agitação por 5 min;
- Lavagem final do gel em água destilada sob agitação por alguns minutos;
- Secagem do gel a temperatura ambiente.

4.8. Detecção, Recuperação e Reamplificação dos FDTs

As bandas referentes aos fragmentos amplificados durante a PCR seletiva foram detectadas através da análise visual dos géis em transiluminador de luz branca. Após a detecção dos FDTs diferencialmente expressos entre os genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para a tolerância à seca, realizou-se a contagem manual e seleção dos fragmentos que seriam retirados do gel, determinando o seu tamanho molecular. O tamanho molecular dos FDTs diferencialmente expressos foi estimado relacionando as distâncias percorridas no gel de poliacrilamida pelos diversos fragmentos dos padrões de tamanho molecular com o seu tamanho em pares de bases (pb). Estas distâncias foram determinadas manualmente com o auxílio de régua e calculadas entre o topo do gel e o centro da banda respectiva. Uma molécula de DNA migra na matriz com mobilidade inversamente proporcional ao \log_{10} da sua massa molecular, que por sua vez, é função do tamanho e da forma da molécula (CORRÊA & POSSIK, 2011). Assim, a equação da regressão linear traçada, relacionando os logaritmos dos valores do tamanho molecular dos padrões com as distâncias de migração (PERES & DINIZ,

2011) foi utilizada na determinação do tamanho molecular dos FDTs que seriam recuperados dos géis.

Os FDTs expressos exclusivamente pelas cultivares tolerantes foram cortados do gel reidratado *overnight* em água destilada, com o auxílio de uma lâmina de bisturi e eluídos do pedaço de gel em 50 µL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl e 1,0 mM de EDTA, pH 8,0) inicialmente através da incubação *overnight* a 4°C e então a 60°C por 2 h e, finalmente, realizando 2-3 ciclos de congelamento e descongelamento e centrifugação rápida do resto da poliacrilamida conforme realizado por PATHAN et al. (2007).

Para a reação de reamplificação utilizou-se uma alíquota de 10 µL do FDT eluído e a combinação de *primers* seletivos que o deu origem. As condições de ciclagem realizadas foram às mesmas da reação de amplificação seletiva (item 4.5.5). Adicionou-se também a esta reação:

- 5,0 µL de 10X tampão (100 mM Tris-HCl, pH 8.8; 500 mM KCl) (*Fermentas*, Lituânia);
- 2,0 µL de MgCl₂ a 25 mM (*Fermentas*, Lituânia);
- 1,0 µL de dNTPs a 10 mM (*Invitrogen Corp.*, CA, USA);
- 1,0 µL do *primer Msel* a 10 µM (sem marcação por fluorescência) (*Sigma Life Science*);
- 1,0 µL do *primer EcoRI* a 10 µM (sem marcação por fluorescência) (*Sigma Life Science*);
- 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (*Fermentas*, Lituânia); e
- Água Milli-Q autoclavada para volume final de 50 µL.

Uma alíquota de 8,0 µL da reação de reamplificação foi analisada através da eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) para verificar a amplificação da banda de interesse.

4.9. Purificação dos FDTs

Os FDTs foram purificados do pedaço do gel de agarose contendo a banda de interesse e/ou diretamente da reação de reamplificação remanescente, utilizando o

Wizard® SV Gel and PCR Clean up system kit (Promega, Alemanha). O procedimento de purificação foi realizado através de centrifugações à temperatura ambiente, conforme descrito a seguir:

(1) FDT purificado a partir do pedaço de gel de agarose:

- Adicionou-se 10 µL de Solução de Ligação a Membrana (4,5 M de isotiocianato de guanidina e 0,5 M de acetato de potássio, pH 5,0) a cada 10 mg do gel de agarose contendo a banda de interesse após a sua dissolução através da incubação a 65°C em banho-maria;

(2) FDT purificado diretamente da reação de reamplificação:

- Adicionou-se igual volume de Solução de Ligação a Membrana (4,5 M de isotiocianato de guanidina e 0,5 M de acetato de potássio, pH 5,0) aos 42 µL remanescentes da reação de reamplificação e homogeneizou-se a mistura;

• **Ligação do DNA**

- Uma minicoluna SV foi montada em tubo coletor estéril de 2,0 mL e então, transferiu-se o volume total descrito em (1) ou em (2) para a minicoluna e incubou-se por 1 min a temperatura ambiente;

- Procedeu-se com a centrifugação a 16000 X g por 1 min;

- O filtrado no tubo coletor foi descartado e retornou-se a minicoluna SV ao tubo;

• **Lavagem do DNA**

- A minicoluna SV foi lavada com a adição de 700 µL de Solução de Lavagem da Membrana (10 mM de acetato de potássio, pH 5,0; 80% de etanol e 16,7 µM de EDTA, pH 8,0), seguida da centrifugação a 16000 X g por 1 min;

- O filtrado foi novamente descartado e retornou-se a minicoluna SV ao tubo;

- Repetiu-se a lavagem com 500 µL de Solução de Lavagem da Membrana com centrifugação por 5 min a 16000 X g;

- O filtrado foi descartado e a minicoluna colocada novamente no tubo coletor para recentrifugação por 1 min a 16000 X g. A tampa da microcentrifuga foi mantida aberta para permitir a evaporação do etanol residual;

• **Eluição do DNA**

- Cuidadosamente transferiu-se a minicoluna SV para novo tubo estéril de microcentrifuga de 1,5 mL e adicionou-se 40 µL de água livre de nuclease diretamente no centro da coluna, incubando-a, em seguida, a temperatura ambiente por 5 min;
- Procedeu-se com a centrifugação por 1 min a 16000 X g;
- Os FDTs eluídos foram estocados em *freezer* a - 20°C para posterior sequenciamento direto e/ou para a clonagem seguida do sequenciamento.

4.10. Clonagem dos FDTs

Após a quantificação por espectrofotometria dos FDTs purificados, realizou-se a ligação dos fragmentos ao vetor de clonagem na razão de 3:1 (inserto: vetor). Para tanto, utilizou-se o pGEM®-T *Easy Vector System I* (Promega, Alemanha), um vetor linearizado com uma única timina no terminal 3' de ambas as extremidades. Consequentemente, isto previne a sua recircularização e refina a eficiência da ligação dos produtos de PCR, que possuem uma adenina adicional em sua extremidade, gerada por certas DNA polimerases termoestáveis. Para a seleção dos transformantes, o vetor contém o gene de resistência ao antibiótico ampicilina. Ademais, possibilita a seleção dos recombinantes através da coloração azul e branca das colônias. A coloração branca das colônias recombinantes se deve a inserção do produto de PCR no sítio de clonagem (*polylinker*), situado no interior do gene *LacZ*, que codifica a enzima β-galactosidase. Com a inativação do gene, não ocorre a transformação enzimática, na presença de IPTG, do substrato incolor *X-gal* em pigmento azul.

Na reação de ligação foram utilizados:

- 75 ng do FDT purificado;
- 25 ng do vetor pGEM-T *Easy* do *kit*;
- 5,0 µL de 2X tampão de ligação da T4 DNA Ligase do *kit*;
- 3,0 U da enzima T4 DNA Ligase do *kit*, e
- Água Milli-Q autoclavada para volume final de 10 µL.

A ligação foi realizada em termociclador a 4°C por 17 h e então 3,0 µL da reação foram adicionados em tubo contendo 50 µL de células de *E. coli* (cepa DH10B) quimicamente competentes, descongeladas rapidamente no gelo. Essa mistura foi

mantida por 30 min no gelo, seguida por choque térmico em banho-maria a 42°C por 30 s e retorno ao gelo para o resfriamento do tubo. As células foram transferidas para 1,0 mL de meio de cultura SOC (1000 µL de SOB; 40 µL de glicose 20% e 40 µL de MgCl₂ 1M) e incubadas a 37°C por 1 h sob agitação de 220 rpm. Por fim, as células de *E. coli* foram espalhadas em placas de cultura contendo meio 2XTY sólido, antibiótico ampicilina (50 µg/mL), X-gal 2% e IPTG a 100 mM.

As colônias transformantes (cor branca) foram transferidas, com o auxílio de palitos de madeira autoclavados, para placas tipo ELISA, contendo em cada poço 150 µL de meio de cultura líquido 2xTY com glicerol 8% e antibiótico ampicilina (50 µg/mL). Após a incubação em estufa bacteriológica por 16 h a 37°C, as placas foram estocadas em *ultrafreezer* a - 80°C.

4.11. Preparação do DNA Plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando o *NucleoSpin® Plasmid kit* (MACHEREY-NAGEL, Alemanha), um método rápido de preparação através da lise SDS/alcalina. Neste procedimento, os contaminantes, tais como sais, metabólitos e componentes celulares macromoleculares solúveis são removidos enquanto o DNA plasmidial fica ligado à coluna de sílica e a seguir é eluído sob condições de baixa força iônica com tampão levemente alcalino. O DNA de alta pureza pode ser utilizado em aplicações posteriores como o sequenciamento automatizado de DNA com fluorescência. Segue abaixo a descrição do método de extração:

- **Cultivo e Colheita das Células Bacterianas**

- Os inóculos foram preparados utilizando-se palitos de madeira autoclavados para transferir as colônias transformantes para placas de 96 poços tipo *deep well* contendo 1,0 mL de meio CG (*Circlegrow*) e antibiótico ampicilina (50 µg/mL). A incubação para o crescimento bacteriano foi realizada em *shaker* por 22 h a 37°C sob agitação a 300 rpm;

- O inóculo foi centrifugado a 3.040 X g por 2 min a 4°C e o sobrenadante descartado por inversão das placas na pia, sendo estas deixadas de boca para baixo em cima de papel absorvente para a remoção do sobrenadante residual.

- **Lise Celular**

- Adicionou-se 250 μ L de tampão A1 do *kit* (contém RNase A) e resuspendeu-se completamente o *pellet* (precipitado) de células bacterianas por meio da agitação em vórtex;

- Adicionou-se 250 μ L de tampão A2 do *kit* (contém SDS e NaOH) e homogeneizou-se por meio da inversão dos tubos por 6-8 vezes. Em seguida, a incubação foi realizada a temperatura ambiente por 5 min;

- Adicionou-se 300 μ L de tampão A3 do *kit* (contém hidrocloreto de guanidina) com a homogeneização através da inversão dos tubos por 6-8 vezes.

- **Clarificação do Lisado (Resíduos Celulares)**

- Realizou-se a centrifugação por 5 min a 11.000 X g a temperatura ambiente.

- **Ligação do DNA**

- Adicionou-se aproximadamente 750 μ L do sobrenadante em coluna *NucleoSpin® Plasmid* acondicionada em tubo coletor de 2,0 mL e centrifugou-se por 1 min a 11.000 X g a temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante, retornando a coluna ao tubo.

- **Lavagem da Membrana de Sílica**

- Adicionou-se 600 μ L de tampão A4 do *kit* (contém etanol 95%), seguido de centrifugação a 11.000 X g por 1 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a coluna recolocada no tubo.

- **Secagem da Membrana de Sílica**

- Realizou-se nova centrifugação a 11.000 X g por 2 min a temperatura ambiente.

- **Eluição do DNA**

- A coluna foi acondicionada em tubo estéril de microcentrífuga de 1,5 mL e então foi adicionado 50 μ L de tampão AE (5,0 mM de Tris/HCl, pH 8,5) do *kit*. A incubação foi realizada por 5 min a temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 11.000 X g por 1 min na mesma temperatura;

- O DNA plasmidial foi armazenado em *freezer* a -20°C até a utilização.

4.12. Sequenciamento dos FDTs

- **Amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

O sequenciamento dos FDTs após a clonagem foi realizado através do método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER et al., 1977), utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems - PE, Inc., CA, USA). A reação de seqüenciamento foi montada em microplacas conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Reação de seqüenciamento de DNA.

COMPONENTES	VOLUME
DNA do FDT	100 ng
* Tampão <i>Save Money</i>	3,0 µL
** <i>Primer T7</i> ou *** <i>Primer SP6</i> (10 pmoles/µL)	1,0 µL
<i>BigDye Terminator</i>	1,0 µL
Água Milli-Q autoclavada	q.s.p. volume total de 10 µL

* Tampão *Save Money*: 5 mM MgCl₂, 200 mM Tris-HCl pH 9,0

** *Primer T7*: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

*** *Primer SP6*: 5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'

O sequenciamento foi realizado, separadamente, nas direções *Forward* (F) e *Reverse* (R). Foram seqüenciados quatro clones para verificar a possibilidade de existência de mais de um tipo de transcrito na banda recuperada do gel de poliacrilamida. Seguem as condições de ciclagem realizadas em termociclador:

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

No caso dos FDTs que passaram por sequenciamento direto utilizou-se os *primers EcoRI/MseI* que deram origem a cada fragmento, sendo utilizados, separadamente, para seqüenciar nas direções *Forward* (F) e *Reverse* (R).

- **Lavagem das Reações para o Sequenciamento**

O procedimento de lavagem dos produtos da amplificação por PCR foi realizado conforme descrito abaixo:

- Foram adicionados 80 μ L de isopropanol 75%, seguido de incubação das amostras a 20°C por 15 min e centrifugação a 3.040 x g a 20°C por 30 min;
- O sobrenadante foi descartado através da inversão da microplaca, mantendo-a virada para baixo sobre papel absorvente;
- Ao precipitado de DNA foram adicionados 200 μ L de etanol 70% para a remoção do sal residual e a centrifugação foi realizada a 3.040 x g por 10 min a 20°C;
- O sobrenadante foi descartado conforme etapa descrita anteriormente e o passo da lavagem com etanol 70% foi repetido;
- O sobrenadante foi descartado através da inversão da microplaca e o etanol residual eliminado por meio de pulso de centrifugação de 20 s com a microplaca virada para baixo e forrada com papel absorvente, usando 1 como valor de aceleração/desaceleração da centrífuga;
- As amostras foram secas em estufa bacteriológica a 37°C por 15 min;

Para o sequenciamento dos FDTs em seqüenciador automático de DNA *Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer* (*Applied Biosystems - PE, Inc., CA, USA*), adicionou-se 10 μ L de formamida às amostras, seguido de desnaturação a 95°C por 5 min e resfriamento no gelo.

4.13. Análise dos FDTs

As seqüências de nucleotídeos dos FDTs foram analisadas pelos programas *Phred* (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998), *Phrap* (GREEN, 1996) e *cross_match* (EWING & GREEN, 1998) para a verificação da qualidade das bases e remoção das seqüências de nucleotídeos correspondentes ao vetor de clonagem.

As pesquisas para a identificação de similaridade de seqüência foram promovidas por meio do algoritmo BlastX da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) contra o banco de dados públicos não redundantes de proteínas. Foi adotado *E-value* de $1e^{-5}$

como ponto de corte para a aceitação de funções similares. As sequências dos FDTs que apresentaram baixa ou nenhuma similaridade com as depositadas no banco de proteínas foram pesquisadas por meio dos algoritmos BlastN e tBlastX contra o banco de dados públicos não redundantes de nucleotídeos. Além disso, todos os FDTs foram analisados através do algoritmo BlastX contra o banco de dados de famílias de domínios protéicos, ProDom (<http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/form.php>). No caso dos FDTs que apresentaram similaridade com proteínas hipotéticas, estas foram consultadas no banco de dados de proteínas (UniProtKB) (<http://www.uniprot.org>) para verificar as anotações de funções biológicas no *Gene Ontology* (GO). Finalmente, os FDTs sem quaisquer similaridades com sequências dos bancos de dados (*no hits*) foram analisados através do alinhamento de suas sequências utilizando a ferramenta ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento de Estresse Hídrico em Cana-de-Açúcar

Foi possível observar a redução do volume de poros do solo com água do 1º ao 10º dia de suspensão da rega (Tabela 7), comprovando o estresse hídrico gradual ao qual foram submetidas as três cultivares de cana-de-açúcar no decorrer das épocas de amostragem (EAs). A Figura 4 ilustra o aspecto visual das cultivares ao longo das quatro coletas (EA), evidenciando a maior sensibilidade ao estresse hídrico da cultivar sensível, SP86-155 quando comparada com as cultivares tolerantes à seca, SP83-5073 e RB867515. A cultivar sensível apresentou amarelecimento, murchamento (redução da turgescência) e enrolamento das folhas superior ao observado nas cultivares tolerantes.

1ª Época de Amostragem (1 dia após a supressão da rega):



(A)



(B)

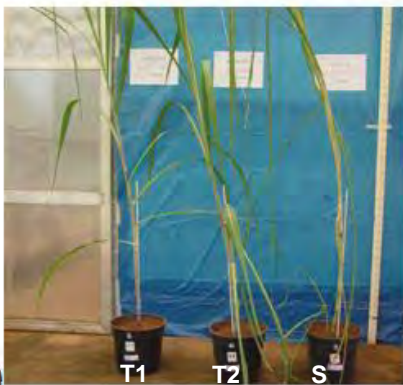


(C)

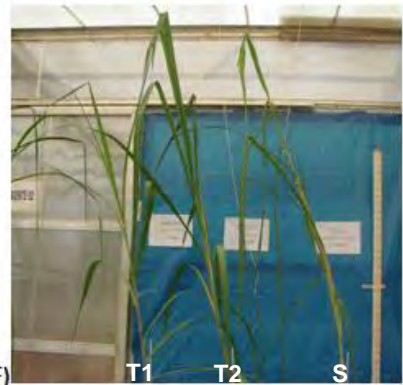
2ª Época de Amostragem (3 dias após a supressão da rega):



(D)

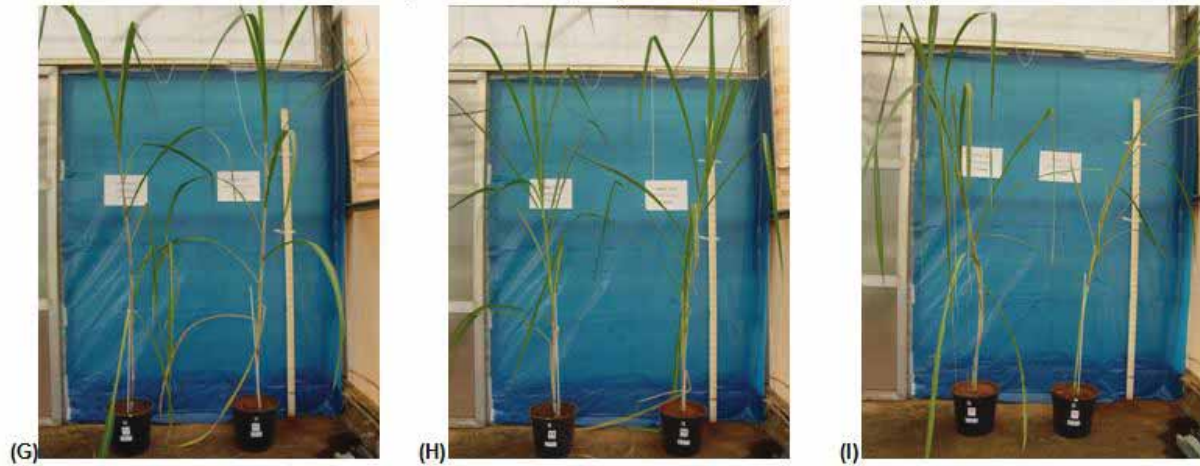


(E)



(F)

3ª Época de Amostragem (5 dias após a supressão da rega):



4ª Época de Amostragem (10 dias após a supressão da rega): (L)

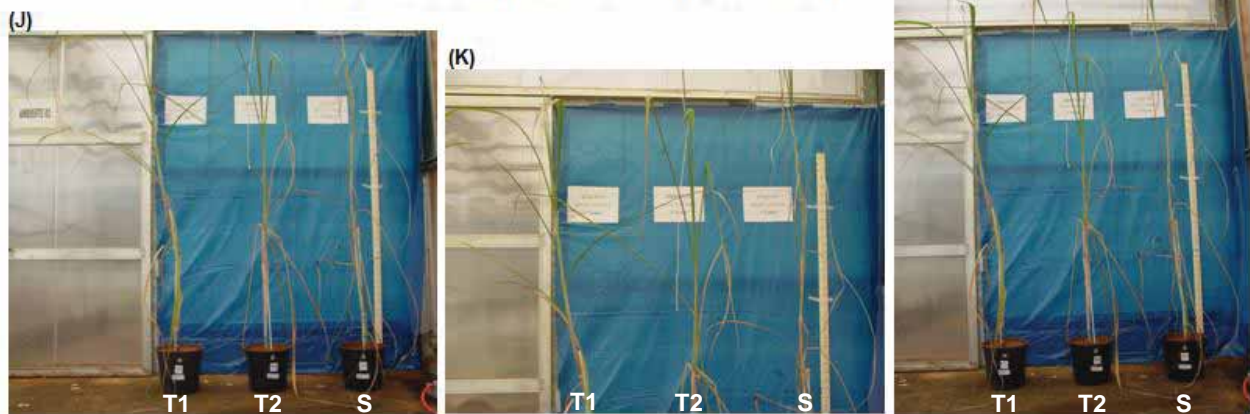


Figura 4. Aspecto visual das três cultivares de cana-de-açúcar durante as quatro épocas de amostragem. (A) cv SP83-5073, respectivamente, planta-controle e planta sob estresse hídrico; (B) cv RB867515, respectivamente, planta-controle e planta sob estresse hídrico; (C) cv SP86-155, respectivamente, planta-controle e planta sob estresse hídrico; (D-F) Diferentes destaques das três cultivares sob estresse hídrico, respectivamente, cv SP83-5073, cv RB867515 e cv SP86-155; (G) cv SP83-5073, respectivamente, planta-controle e planta sob estresse hídrico; (H) cv RB867515, respectivamente, planta-controle e planta sob estresse hídrico; (I) cv SP86-155, respectivamente, planta-controle e planta sob estresse hídrico; (J-K) Diferentes destaques das três cultivares sob estresse hídrico, respectivamente, cv SP83-5073, cv RB867515 e cv SP86-155. Siglas: T1 = SP83-5073; T2 = RB867515; S = SP86-155.

5.2. Qualidade do RNA Total e dos cDNAs Dupla-Fita e Técnica de cDNA-AFLP

A leitura do RNA total realizada em espectrofotômetro indicou que a relação A260/280 nm e A260/230 nm variou entre 1,80 e 2,00 (dados não apresentados), comprovando adequado teor de pureza de todas as amostras. Além disso, a análise do gel de agarose desnaturante comprovou a integridade do RNA total das 24 amostras (Figura 5) por meio da visualização das bandas dos RNAs ribossomais 18 S e 28 S, que estavam íntegros.

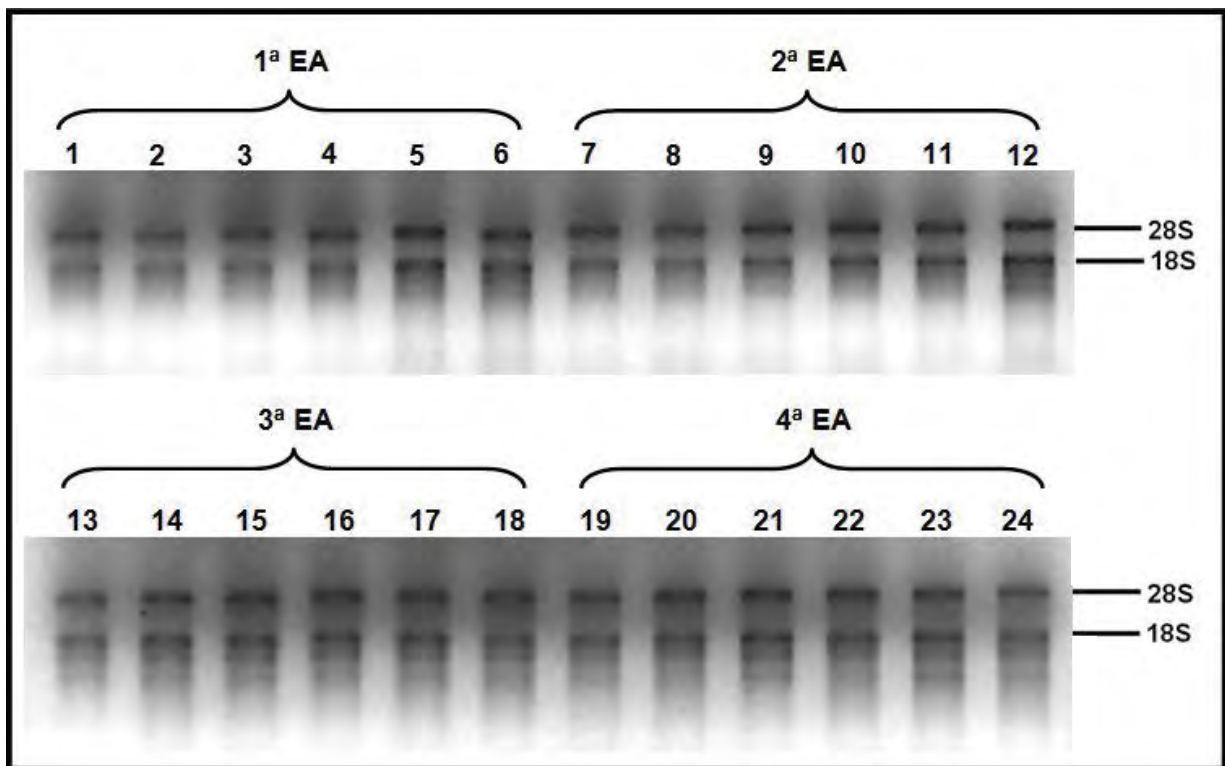


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em condições desnaturantes. Em cada linha do gel foi aplicado 1,0 µg de RNA total extraído do *pool* de tecido foliar (folha+1) das quatro repetições biológicas das cultivares de cana-de-açúcar. **Linha 1-2; 7-8; 13-14 e 19-20:** representam as amostras da cv SP83-5073 e cada par de números referem-se às amostras da cana sob adequado suprimento de água (controle) e sob supressão da rega (estresse hídrico), respectivamente; **Linha 3-4; 9-10; 15-16 e 21-22:** representam as amostras da cv RB867515 e cada par de números referem-se às amostras da cana sob adequado suprimento de água (controle) e sob supressão da rega (estresse hídrico), respectivamente; **Linha 5-6; 11-12; 17-18 e 23-24:** representam as amostras da cv SP86-155 e cada par de números referem-se às amostras da cana sob adequado suprimento de água (controle) e sob supressão da rega (estresse hídrico), respectivamente. Estão indicadas as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais, 18 S e 28 S.

Sendo assim, os RNAs estavam adequados para a síntese dos cDNAs dupla-fita, que seriam utilizados no cDNA-AFLP. De acordo com DINIZ (2007), o grau de pureza do molde (DNA genômico ou cDNA) é determinante para a reprodutibilidade do AFLP, pois interfere na restrição, que se for incompleta, gera fragmentos parcialmente digeridos, predominantemente de alto peso molecular, alterando o perfil de bandas resultante. Os cDNAs dupla-fita sintetizados a partir do RNA total foram quantificados e analisados quanto a pureza através da leitura em espectrofotômetro, que comprovou adequado grau de pureza das amostras (dados não apresentados).

Na técnica de cDNA-AFLP, as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI* cortam os diferentes cDNAs, respectivamente, uma vez (corte raro) e em um ou em ambos os lados adjacentes (corte frequente), produzindo fragmentos predominantemente de tamanho entre 100 e 1000 pb (JAYARAMAN et al., 2008). Consistente com o relato dos autores, no presente estudo em cana-de-açúcar, os fragmentos obtidos após a reação de restrição, apresentaram-se na faixa de tamanho molecular de 50 a 1000 pb, sugerindo adequada digestão dos cDNAs. A partir da análise prévia de 24 combinações de *primers* seletivos *EcoRI/MseI* (Tabela 4), 14 combinações foram selecionadas (Tabela 5) para a realização do cDNA-AFLP com todas as amostras experimentais.

5.3. Análise do cDNA-AFLP, Reamplificação e Sequenciamento dos FDTs

A análise do cDNA-AFLP realizado em seqüenciador automático de DNA permitiu determinar o número de FDTs diferencialmente expressos entre as cultivares tolerantes e sensível, que foram detectados somente nas amostras da cana sob estresse hídrico, isto é, sem expressão detectável nas condições-controle. Com a computação manual dos dados foi constatado, com as 14 combinações de *primers* seletivos, 1.633 FDTs (bandas) expressos somente nas cultivares tolerantes. Em média, cada combinação resultou em 58,3 FDTs diferencialmente expressos. Os fragmentos visualizados apresentavam tamanho molecular entre 50 e 500 pb (amplitude de tamanho determinada com a utilização do padrão interno - ROX).

No total, a cultivar SP83-5073 apresentou 839 FDTs e destes, 304 foram detectados exclusivamente nas plantas sob supressão da rega (sem expressão

detectada nas plantas-controles), correspondendo a 36,23% dos fragmentos (Tabela 8). A cultivar RB867515 apresentou um total de 794 FDTs, sendo 284 expressos exclusivamente durante o estresse hídrico, o que corresponde a 35,77% dos fragmentos (Tabela 9). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por GIMENEZ (comunicação pessoal) que, em estudo de cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida utilizando o palmito de cultivares de cana contrastantes em tolerância à seca, observou que a maioria dos FDTs diferencialmente expressos entre os genótipos tolerantes (SP83-5073 e RB867515) e sensível (SP86-155) também apresentou algum nível de expressão nas plantas-controles. Os resultados obtidos parecem indicar que grande parte dos FDTs diferencialmente expressos não é induzida exclusivamente na situação de estresse hídrico, sugerindo que estes transcritos possam estar sujeitos à modulação da expressão pelo estresse, resultando na variação da intensidade de sua expressão. Entretanto, como estes fragmentos correspondem a transcritos diferencialmente expressos entre genótipos contrastantes submetidos ao estresse hídrico, eles podem estar relacionados ao caráter de tolerância apresentado pelas cultivares SP83-5073 e RB867515 em que foram detectados.

Para possibilitar a recuperação das bandas referentes aos FDTs expressos exclusivamente nas cultivares tolerantes sob estresse hídrico, realizou-se o cDNA-AFLP em eletroforese vertical com gel de poliacrilamida (Figura 6). Os FDTs diferencialmente expressos entre as cultivares tolerantes e sensível foram determinados através da análise visual das bandas no gel de poliacrilamida corado com prata, conforme ilustrado na Figura 7. Nesta análise do cDNA-AFLP com as 14 combinações de *primers* seletivos *EcoRI/MseI*, foram obtidos 1.316 FDTs expressos somente nas cultivares tolerantes e destes, 630 FDTs foram identificados na cultivar SP83-5073 (Tabela 8) e 686 FDTs na cultivar RB867515 (Tabela 9). Em média, cada combinação de *primers* resultou em 47 FDTs diferencialmente expressos, com tamanhos variando entre 50 e 1000 pb.

Cabe ressaltar que as diferenças observadas nos resultados obtidos através das análises de cDNA-AFLP no sequenciador automático de DNA e na eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, no tocante ao tamanho molecular e número total de FDTs, devem-se provavelmente aos distintos poder de resolução, de parâmetros adotados

para a migração eletroforética e para a detecção dos fragmentos, assim como ao tipo de padrão de tamanho molecular e de polímero utilizado como matriz destes dois procedimentos.

Dos 1.316 FDTs diferencialmente expressos, que foram detectados em gel de poliacrilamida, 353 fragmentos (26,82%) foram selecionados com base na facilidade de recuperá-los do gel. O tamanho molecular dos FDTs excisados do gel foi estimado recorrendo à equação de regressão linear. Como esta estimativa trata-se de uma extrapolação, os valores obtidos não são precisos. De qualquer forma, o método revelou-se de grande eficácia para estimar o tamanho dos fragmentos, visto que, para a maioria dos FDTs, houve correspondência com o tamanho molecular determinado pelo posterior sequenciamento destes fragmentos.

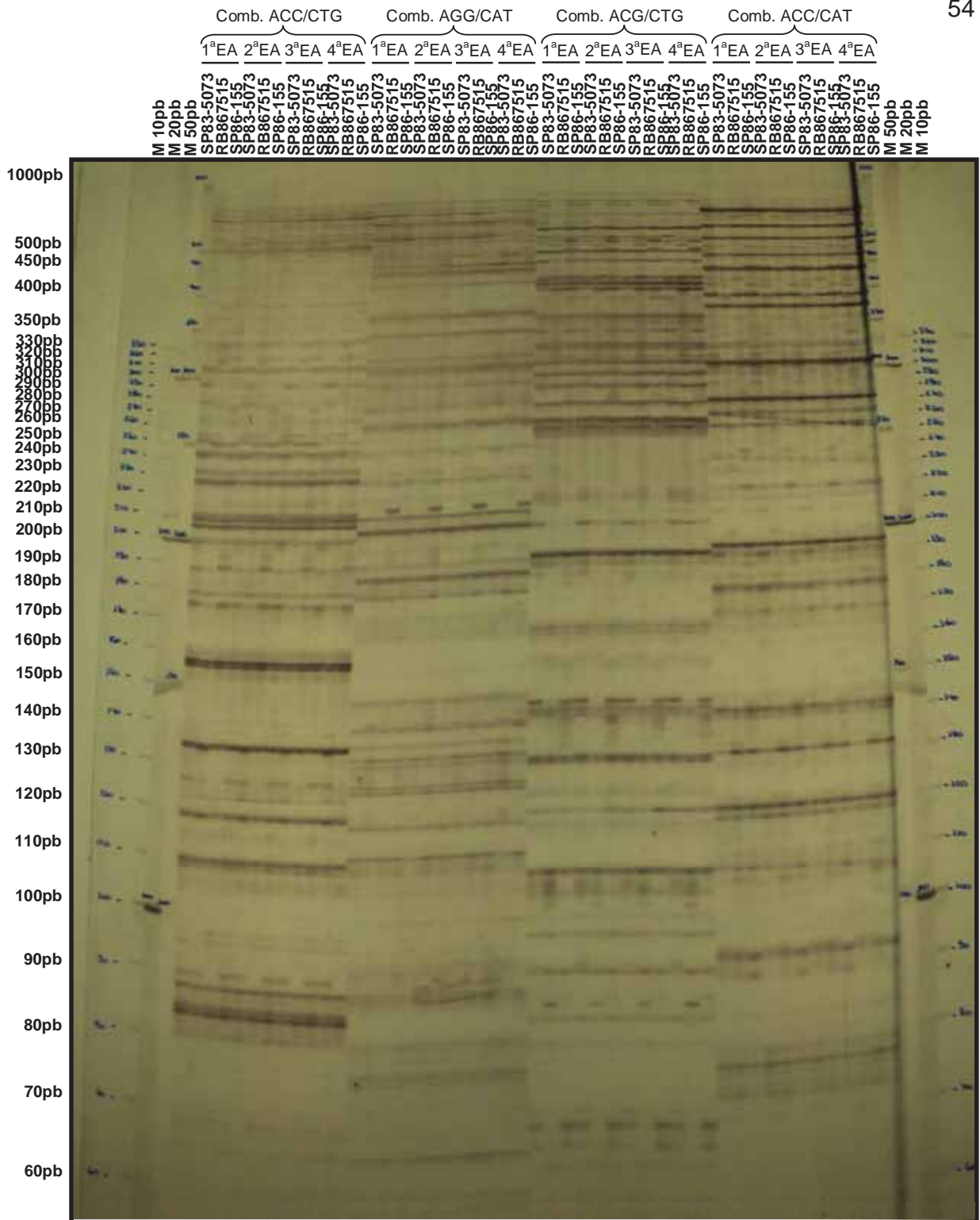


Figura 6. Perfil de expressão gênica da folha+1 de três cultivares de cana-de-açúcar sob supressão da rega, exibido por meio da técnica de cDNA-AFLP. Um exemplo mostrando a amplificação seletiva com quatro combinações de *primers* *EcoRI/MseI*. **Linhas 1-3:** marcador de tamanho molecular de 10 pb, de 20 pb e de 50 pb, respectivamente; **Linhas de 4-15:** combinação ACC/CTG; **Linhas de 16-27:** comb. AGG/CAT; **Linhas de 28-39:** comb. ACG/CTG; **Linhas de 40-51:** comb. ACC/CAT; **Linhas de 52-54:** marcador de peso molecular de 50 pb, de 20 pb e de 10 pb, respectivamente.

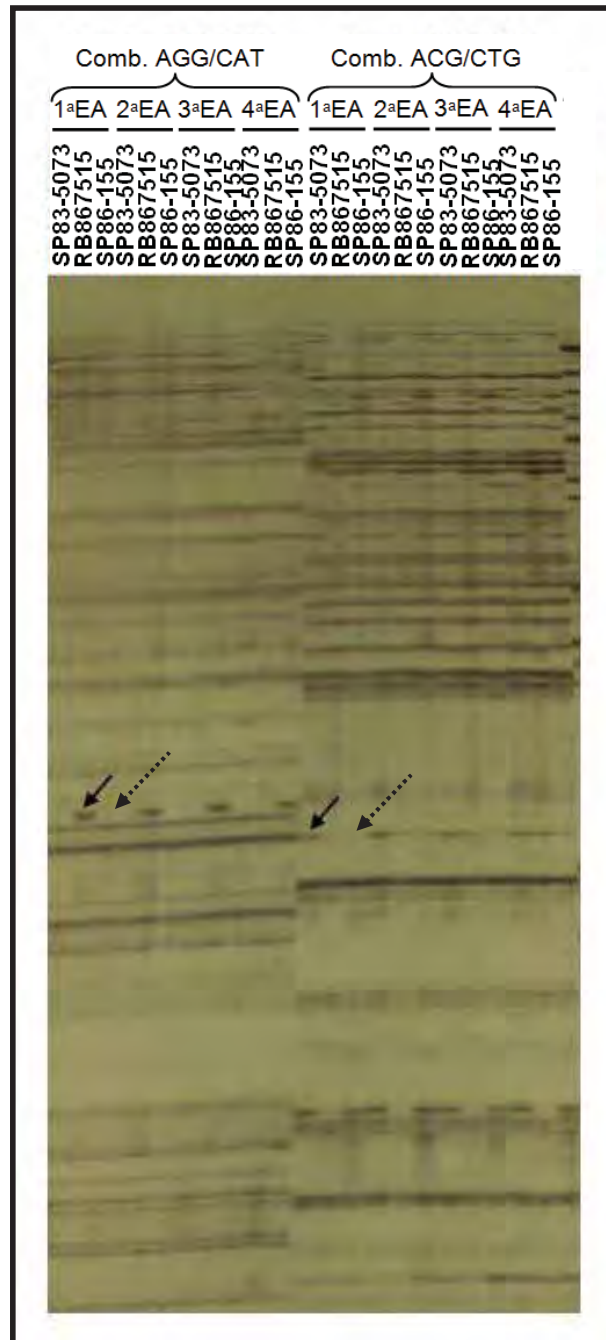


Figura 7. Detalhe do padrão de bandas obtidos no cDNA-AFLP com duas combinações de primers *EcoRI/MseI*. **Linhas de 1-12:** combinação AGG/CAT; **Linhas de 13-24:** combinação ACG/CTG. As setas contínuas apontam dois FDTs expressos exclusivamente pelas cultivares tolerantes de cana-de-açúcar, RB867515 e SP83-5073, respectivamente, enquanto as setas descontínuas evidenciam a ausência dos fragmentos na cultivar sensível à seca, SP86-155.

Tabela 8. Resultado da análise de cDNA-AFLP com 14 combinações de *primers* seletivos *EcoRI-MseI*, referente à cv de cana tolerante à seca, **SP83-5073**. São apresentados os números de FDTs detectados exclusivamente na cv tolerante para cada época de amostragem (EA) e no total por EA. Em **(A)** resultado obtido da eletroforese capilar no seqüenciador automático de DNA *Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer* e em **(B)** da eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6% (p/v) desnaturante.

Combinação <i>Primers EcoRI/ MseI</i>	EA	(A) cDNA-AFLP: Seqüenciador de DNA		(B) cDNA-AFLP: gel poliacrilamida 6%	
		Nº FDTs ()*	Nº Total FDTs()*	Nº FDTs	Nº Total FDTs
ACA/CAG	1 ^a	4 (1)	17 (1)	13	44
	2 ^a	4 (0)		6	
	3 ^a	4 (0)		11	
	4 ^a	5 (0)		14	
ACT/CAA	1 ^a	0 (0)	10 (7)	18	57
	2 ^a	3 (2)		11	
	3 ^a	5 (4)		16	
	4 ^a	2 (1)		12	
ACT/CAG	1 ^a	6 (2)	16 (9)	10	34
	2 ^a	2 (1)		9	
	3 ^a	3 (2)		7	
	4 ^a	5 (4)		8	
ACT/CTG	1 ^a	7 (2)	62 (27)	9	40
	2 ^a	30 (11)		12	
	3 ^a	13 (9)		8	
	4 ^a	12 (5)		11	
ACT/CTT	1 ^a	11 (8)	43 (24)	17	60
	2 ^a	7 (5)		13	
	3 ^a	12 (6)		13	
	4 ^a	13 (5)		17	
AAG/CTC	1 ^a	36 (12)	89 (30)	7	36
	2 ^a	14 (6)		9	
	3 ^a	13 (4)		9	
	4 ^a	26 (8)		11	
AAG/CAG	1 ^a	10 (0)	64 (16)	10	51
	2 ^a	17 (6)		13	
	3 ^a	25 (4)		13	
	4 ^a	12 (6)		15	
ACG/CTG	1 ^a	12 (7)	71 (25)	13	55
	2 ^a	30 (2)		15	
	3 ^a	13 (5)		12	
	4 ^a	16 (11)		15	

continuação

Combinação Primers EcoRI/ MseI	EA	(A) cDNA-AFLP: Seqüenciador de DNA		(B) cDNA-AFLP: gel poliácridamida 6%	
		Nº FDTs ()*	Nº Total FDTs()*	Nº FDTs	Nº Total FDTs
ACG/CAA	1 ^a	10 (2)	49 (22)	5	31
	2 ^a	13 (4)		7	
	3 ^a	13 (3)		7	
	4 ^a	13 (13)		12	
AGG/CAT	1 ^a	26 (4)	91 (27)	15	44
	2 ^a	12 (0)		10	
	3 ^a	35 (18)		9	
	4 ^a	18 (5)		10	
AAC/CTG	1 ^a	8 (4)	32 (14)	13	56
	2 ^a	10 (7)		11	
	3 ^a	5 (1)		16	
	4 ^a	9 (2)		16	
ACC/CAT	1 ^a	17 (4)	65 (30)	9	30
	2 ^a	20 (11)		6	
	3 ^a	11 (11)		7	
	4 ^a	17 (4)		8	
ACC/CTG	1 ^a	13 (8)	130 (46)	10	42
	2 ^a	29 (16)		9	
	3 ^a	21 (10)		8	
	4 ^a	67 (12)		15	
AGC/CTC	1 ^a	22 (9)	100 (26)	18	50
	2 ^a	16 (4)		7	
	3 ^a	22 (7)		11	
	4 ^a	40 (6)		14	
1 ^a EA: Nº Total FDTs nas 14 combinações ()*		182 (63)	---	167	---
2 ^a EA: Nº Total FDTs nas 14 combinações ()*		207 (75)	---	138	---
3 ^a EA: Nº Total FDTs nas 14 combinações ()*		195 (84)	---	147	---
4 ^a EA: Nº Total FDTs nas 14 combinações ()*		255 (82)	---	178	---
Nº Total de FDTs obtidos com as 14 combinações ()*		839 (304)	---	630	---

()* = Entre parênteses, o número de FDTs detectados somente na amostra de cana-de-açúcar submetida à deficiência hídrica do solo, ou seja, representa os fragmentos que não aparecem na respectiva amostra de cana sob condições controle (adequado suprimento hídrico do solo). EA (Época de Amostragem): 1^a = 1 dia; 2^a = 3 dias; 3^a = 5 dias e 4^a = 10 dias.

Tabela 9. Resultado da análise de cDNA-AFLP com as 14 combinações de *primers* seletivos *EcoRI-MseI*, referente à cv de cana tolerante à seca, **RB867515**. São apresentados os números de FDTs detectados exclusivamente na cv tolerante para cada época de amostragem (EA) e no total por EA. Em **(A)** resultado obtido da eletroforese capilar no seqüenciador automático de DNA *Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer* e em **(B)** da eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6% (p/v) desnaturante.

Combinação <i>Primers EcoRI/ MseI</i>	EA	(A) cDNA-AFLP: Seqüenciador de DNA		(B) cDNA-AFLP: gel poliacrilamida 6%	
		Nº FDTs ()*	Nº Total FDTs ()*	Nº FDTs	Nº Total FDTs
ACA/CAG	1 ^a	6 (2)	28 (9)	7	36
	2 ^a	7 (1)		4	
	3 ^a	7 (2)		11	
	4 ^a	8 (4)		14	
ACT/CAA	1 ^a	7 (2)	21 (9)	19	59
	2 ^a	3 (1)		12	
	3 ^a	4 (1)		18	
	4 ^a	7 (5)		10	
ACT/CAG	1 ^a	5 (2)	19 (13)	10	43
	2 ^a	5 (4)		13	
	3 ^a	5 (3)		10	
	4 ^a	4 (4)		10	
ACT/CTG	1 ^a	5 (4)	47 (19)	14	61
	2 ^a	15 (4)		21	
	3 ^a	12 (2)		12	
	4 ^a	15 (9)		14	
ACT/CTT	1 ^a	9 (6)	48 (22)	26	69
	2 ^a	6 (2)		13	
	3 ^a	14 (3)		14	
	4 ^a	19 (11)		16	
AAG/CTC	1 ^a	32 (8)	84 (23)	10	46
	2 ^a	14 (3)		12	
	3 ^a	17 (3)		10	
	4 ^a	21 (9)		14	
AAG/CAG	1 ^a	2 (0)	41 (10)	9	32
	2 ^a	10 (3)		8	
	3 ^a	20 (6)		8	
	4 ^a	9 (1)		7	
ACG/CTG	1 ^a	11 (4)	89 (40)	14	60
	2 ^a	31 (4)		14	
	3 ^a	11 (5)		16	
	4 ^a	36 (27)		16	

continuação

Combinação de <i>Primers EcoRI/ MseI</i>	EA	(A) cDNA-AFLP: Seqüenciador de DNA		(B) cDNA-AFLP: gel poliacrilamida 6%	
		Nº FDTs ()*	Nº Total FDTs ()*	Nº FDTs	Nº Total FDTs
ACG/CAA	1 ^a	7 (4)	44 (26)	2	22
	2 ^a	8 (3)		7	
	3 ^a	19 (9)		5	
	4 ^a	10 (10)		8	
AGG/CAT	1 ^a	10 (1)	54 (16)	11	30
	2 ^a	12 (6)		5	
	3 ^a	18 (5)		5	
	4 ^a	14 (4)		9	
AAC/CTG	1 ^a	8 (2)	35 (9)	24	90
	2 ^a	9 (4)		21	
	3 ^a	7 (1)		24	
	4 ^a	11 (2)		21	
ACC/CAT	1 ^a	8 (2)	49 (13)	11	40
	2 ^a	18 (5)		9	
	3 ^a	12 (4)		8	
	4 ^a	11 (2)		12	
ACC/CTG	1 ^a	11 (4)	138 (50)	16	55
	2 ^a	29 (6)		14	
	3 ^a	15 (4)		11	
	4 ^a	83 (36)		14	
AGC/CTC	1 ^a	16 (4)	97 (25)	13	43
	2 ^a	15 (3)		10	
	3 ^a	21 (9)		9	
	4 ^a	45 (9)		11	
1 ^a EA: Nº Total FDTs nas 14 combinações ()*		137 (45)	---	186	---
2 ^a EA: Nº Total FDTs nas 14 combinações ()*		182 (49)	---	163	---
3 ^a EA: Nº Total FDTs nas 14 combinações ()*		182 (57)	---	161	---
4 ^a EA: Nº Total FDTs nas 14 combinações ()*		293 (133)	---	176	---
Nº Total de FDTs obtidos com as 14 combinações ()*		794 (284)	---	686	---

()* = Entre parênteses, o número de FDTs detectados somente na amostra de cana-de-açúcar submetida à deficiência hídrica do solo, ou seja, representa os fragmentos que não aparecem na amostra de cana sob condições controle (adequado suprimento hídrico do solo). EA (Época de Amostragem): 1^a = 1 dia; 2^a = 3 dias; 3^a = 5 dias e 4^a = 10 dias.

Após a recuperação dos FDTs do gel de poliacrilamida, uma alíquota de 10 μL do eluído foi utilizada para a reamplificação por PCR. O tamanho molecular dos fragmentos reamplificados foi verificado através da análise em gel de agarose (Figura 8) e àqueles com tamanho muito discrepante do estimado foram descartados do presente trabalho.

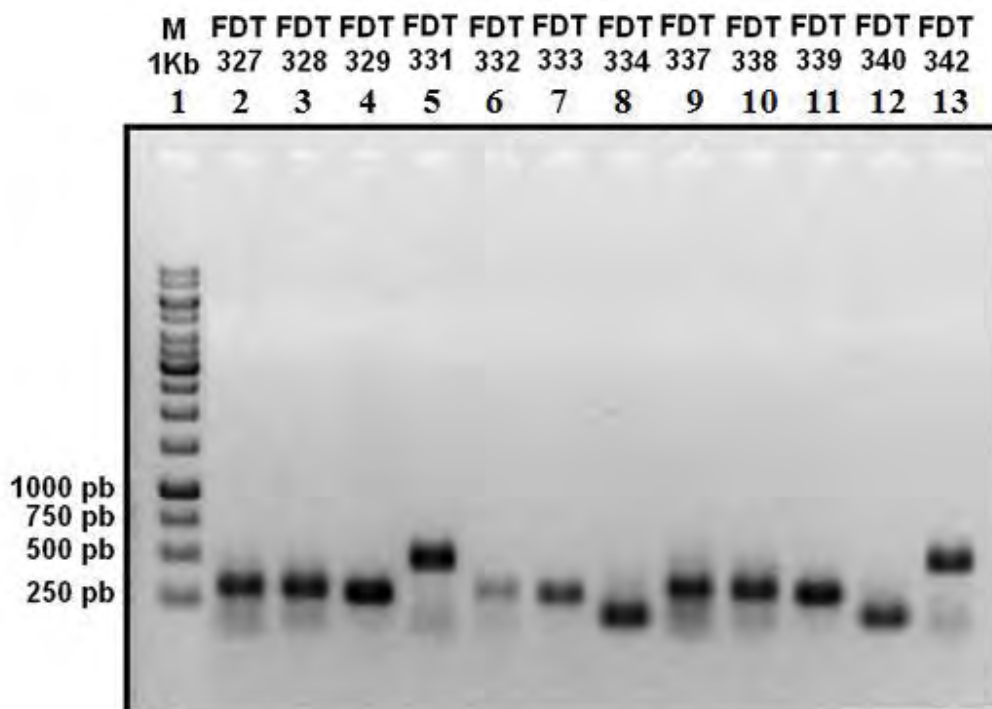


Figura 8. Visualização em gel de agarose 1% (p/v) dos FDTs após a reação de reamplificação. Em cada canaleta do gel foi aplicado 8,0 μL da reação de reamplificação. **Linha 1:** 5,0 μL de marcador de tamanho molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Lituânia); **Linha 2:** FDT expresso pela cv SP83-5073 (1^a EA), com tamanho molecular estimado de 296 pb; **Linha 3-4:** FDTs expressos pela cv RB867515 (1^a EA), com tamanho molecular estimado de, respectivamente, 280 pb e 271 pb; **Linha 5:** FDT expresso pela cv SP83-5073 (2^a EA), com tamanho molecular estimado de 549 pb; **Linha 6-8:** FDTs expressos pela cv RB867515 (2^a EA), com tamanho molecular estimado de, respectivamente, 290 pb, 271 pb e 167 pb; **Linha 9:** FDT expresso pela cv SP83-5073 (3^a EA), com tamanho molecular estimado de 294 pb; **Linha 10-12:** FDTs expressos pela cv RB867515 (3^a EA), com tamanho molecular estimado de, respectivamente, 289 pb, 271 pb e 168 pb; **Linha 13:** FDT expresso pela cv SP83-5073 (4^a EA), com tamanho molecular estimado de 535 pb.

Dos FDTs recuperados do gel de poliacrilamida, 53 (15%) foram aleatoriamente selecionados para a reamplificação e sequenciamento. Destes, 30 fragmentos foram reamplificados e então purificados do gel de agarose para o sequenciamento direto. Entretanto, somente cinco foram passíveis de utilização, visto que a maioria não apresentou boa qualidade na leitura das bases. Uma provável interpretação para o insucesso do sequenciamento direto dos FDTs pode ser a existência de mais de um tipo de transcrito por banda recuperada do gel, o que compromete o sequenciamento. Por essa razão, a estratégia de sequenciamento direto dos fragmentos foi suspensa, partindo-se para a clonagem antes do sequenciamento. A partir dos 23 FDTs que foram clonados e posteriormente seqüenciados, constatou-se que algumas bandas (FDTs) apresentavam mais de um tipo de transcrito com tamanho molecular próximo ao estimado; isto se deve, provavelmente, a incapacidade da matriz do gel de poliacrilamida a 6% de separar fragmentos com pequena diferença de tamanho.

Os FDTs cujo sequenciamento foi bem sucedido tiveram suas seqüências pesquisadas em bancos de dados públicos não redundantes de proteínas e de nucleotídeos (Tabelas 10 e 11). Tais seqüências foram também submetidas contra o banco de dados de famílias de domínios protéicos (ProDom) (Tabelas 12 e 13). Os resultados revelaram similaridade dos FDTs diferencialmente expressos entre as cultivares contrastantes com genes envolvidos em vários eventos moleculares relacionados às respostas das plantas aos estresses, inclusive ao causado pela seca. Nove FDTs apresentaram baixa ou nenhuma similaridade com seqüências dos bancos de dados, portanto, podem representar genes novos que estejam desempenhando funções importantes na resposta da cana-de-açúcar ao estresse causado pela seca e assim contribuindo para a tolerância destas cultivares estudadas.

Tabela 10. FDTs detectados exclusivamente na cultivar tolerante SP83-5073 de cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico.

# FDT	Combinação	Compr. (pb)	N° Acesso	Anotação do <i>best hit</i> no banco de dados	E-value	% Identidade
1ª EA (1 dia após supressão da rega)						
102-GD26	ACC/CTG	257	BAB33421.1	putative senescence-associated protein [Pisum sativum]	5e-09*	28/30 (93%)
102-GD27	ACC/CTG	258	XP_002442926.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_08g005000 [Sorghum bicolor]	1e-15*	40/44 (91%)
102-GD28	ACC/CTG	260	ACG24648.1	triosephosphate isomerase, cytosolic [Zea mays]	2e-16*	61/66 (92%)
103	ACC/CTG	200	XM_002443686.1	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA (GENE ID: 8064362 SORBIDRAFT_07g000996 hypothetical protein [Sorghum bicolor])	5e-05*	19/32 (59%)
126	AGG/CAT	219	–	<i>Nenhuma similaridade significativa encontrada</i>	–	–
2ª EA (3 dias após supressão da rega)						
109	ACC/CTG	256	BAB33421.1	putative senescence-associated protein [Pisum sativum]	3e-32*	65/72 (90%)
331	AAG/CAG	496	–	<i>Nenhuma similaridade significativa encontrada</i>	–	–
3ª EA (5 dias após supressão da rega)						
135	AGG/CAT	479	–	<i>Nenhuma similaridade significativa encontrada</i>	–	–
235	AAC/CTG	296	XP_002449151.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_05g005800 [Sorghum bicolor]	5e-09*	29/33 (88%)
337	AAG/CAG	308	AAD20307.1	copia-type pol polyprotein [Zea mays]	1e-21*	47/61 (77%)
4ª EA (10 dias após supressão da rega)						
87-G21	ACT/CAG	236	XM_002463910.1	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA (GENE ID: 8059971 SORBIDRAFT_01g009520 hypothetical protein [Sorghum bicolor])	8e-69†	187/205 (91%)
87-G22	ACT/CAG	226	FJ439131.1	Zea mays strain W22 ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit gene, partial cds	1e-16†	92/110 (84%)
119-G15	ACC/CTG	436	FN431665.1	Saccharum hybrid cultivar BAC clone Sh135P16, cultivar R570	2e-132†	292/308 (95%)
119-G16	ACC/CTG	435	XP_002442557.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_08g021885 [Sorghum bicolor]	1e-35*	71/99 (72%)
120-G41	ACC/CTG	258	XP_002442926.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_08g005000 [Sorghum bicolor]	1e-15*	40/44 (91%)
120-G44	ACC/CTG	258	BAF63330.1	phytosulfokine receptor kinase [Oryza sativa Japonica Group]	2e-21*	50/78 (64%)
342	AAG/CAG	494	ACG34827.1	MADS-box transcription factor 47 [Zea mays]	5e-06*	26/33 (79%)
343	AAG/CAG	303	–	<i>Nenhuma similaridade significativa encontrada</i>	–	–

O E-value foi usado para indicar a significância da similaridade da sequência (Altschul et al. 1997).

* *Expect values* do *best match* para o alinhamento de proteína (BlastX).

† *Expect values* do *best match* para o alinhamento de DNA (BlastN).

• *Expect values* do *best match* para o alinhamento de DNA (tBlastX).

Tabela 11. FDTs detectados exclusivamente na cultivar tolerante RB867515 de cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico.

# FDT	Combinação	Compr. (pb)	N° Acesso	Anotação do <i>best hit</i> no banco de dados	E-value	% Identidade
1ª EA (1 dia após supressão da rega)						
128	AGG/CAT	219	–	<i>Nenhuma similaridade significativa encontrada</i>	–	–
222	AAC/CTG	234	AAX96752.1	retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy sub-class [Oryza sativa Japonica Group]	2e-09*	35/47 (74%)
2ª EA (3 dias após supressão da rega)						
111-G38	ACC/CTG	258	BAF63330.1	phytosulfokine receptor kinase [Oryza sativa Japonica Group]	3e-21*	50/78 (64%)
111-G39	ACC/CTG	258	BAB33421.1	putative senescence-associated protein [Pisum sativum]	6e-14*	37/42 (88%)
333	AAG/CAG	273	–	<i>Nenhuma similaridade significativa encontrada</i>	–	–
334-GD13	AAG/CAG	164	–	<i>Nenhuma similaridade significativa encontrada</i>	–	–
334-GD15	AAG/CAG	167	AC124143.2	Oryza sativa Japonica Group chromosome 5 clone OSJNBb0053D02, complete sequence	1e-05*	16/22 (73%)
3ª EA (5 dias após supressão da rega)						
85	ACT/CAG	278	XM_002443090.1	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA (GENE ID: 8061232 SORBIDRAFT_08g010850 hypothetical protein [Sorghum bicolor])	6e-76†	166/170 (98%)
244	AAC/CTG	235	AAX96752.1	retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy sub-class [Oryza sativa Japonica Group]	2e-09*	35/47 (74%)
339	AAG/CAG	273	–	<i>Nenhuma similaridade significativa encontrada</i>	–	–
340	AAG/CAG	164	–	<i>Nenhuma similaridade significativa encontrada</i>	–	–
4ª EA (10 dias após supressão da rega)						
89	ACT/CAG	426	FN431667.1	Saccharum hybrid cultivar BAC clone Sh197G04, cultivar R570	2e-57†	259/320 (81%)
90	ACT/CAG	275	NP_001154500.1	TTF-type zinc finger protein with HAT dimerisation domain [Arabidopsis thaliana] (GENE ID: 6240332 AT2G06541 protein dimerization [Arabidopsis thaliana])	2e-08*	30/46 (65%)
91	ACT/CAG	167	FN431663.1	Saccharum hybrid cultivar BAC clone Sh15N23, cultivar R570	1e-30†	84/88 (95%)
92	ACT/CAG	166	CAN59755.1	hypothetical protein VITISV_034567 [Vitis vinifera]	1e-10*	29/47 (62%)
258	AAC/CTG	235	AAX96752.1	retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy sub-class [Oryza sativa Japonica Group]	2e-09*	35/47 (74%)

O E-value foi usado para indicar a significância da similaridade da sequência (Altschul et al. 1997).

* *Expect values* do *best match* para o alinhamento de proteína (BlastX).

† *Expect values* do *best match* para o alinhamento de DNA (BlastN).

• *Expect values* do *best match* para o alinhamento de DNA (tBlastX).

Tabela 12. Domínios protéicos encontrados na sequência de nucleotídeos dos FDTs detectados exclusivamente na cultivar tolerante SP83-5073 de cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico.

** # FDT	Combinação	Compr. (pb)	* Anotação dos Domínios Protéicos (ProDom)		
			# Domínio	% Identidade	*** E-value
1ª EA (1 dia após supressão da rega)					
102-GD27	ACC/CTG	258	Acid amino transporter permease carrier carrier AAP2 transmembrane AT5G09220/T5E8_20 OSJNBA0076N16.13		
			PDA1H6K0	26/33 (78%)	3e-07
102-GD28	ACC/CTG	260	Isomerase triosephosphate gluconeogenesis fatty biosynthesis acid glycolysis lipid Synthesis pentose		
			PD001005	45/66 (68%)	3e-17
337	AAG/CAG	308	Polyprotein POL DNA GAG-POL reverse protease contains: H integrase RT		
			PD000348	47/62 (75%)	1e-21
			Polyprotein retrotransposon protein putative transposase POL GAG-POL retroelement subclass Unclassified		
			PD529779	28/34 (82%)	3e-10
4ª EA (10 dias após supressão da rega)					
119-G16	ACC/CTG	435	Polyprotein putative protein retrotransposon GAG-POL unclassified TY3-GYPSY sub-class retroelement transposon		
			PD571019	24/32 (75%)	6e-08
			Polyprotein OSJNBA0053F13.6		
			PDA0X572	25/41 (60%)	8e-05
			GAG-POL-ORF2		
			PDA684A5	32/69 (46%)	4e-05
120-G41	ACC/CTG	258	Acid amino transporter permease carrier carrier AAP2 transmembrane AT5G09220/T5E8_20 OSJNBA0076N16.13		
			PDA1H6K0	26/33 (78%)	3e-07
120-G44	ACC/CTG	258	Repeat kinase leucine-rich receptor ATP-binding nucleotide-binding serine/threonineprotein transferase receptor-like resistance		
			PD000020	25/37 (67%)	1e-06

* Resultado obtido com a submissão da sequência dos FDTs contra o banco de dados ProDom, utilizando o algoritmo BlastX.

** Foram exibidos somente os FDTs que apresentaram similaridade de sequência com o banco de dados.

*** O E-value foi usado para indicar a significância da similaridade da sequência (Altschul et al. 1997).

Tabela 13. Domínios protéicos encontrados na sequência de nucleotídeos dos FDTs detectados exclusivamente na cultivar tolerante RB867515 de cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico.

** # FDT	Combinação	Compr. (pb)	* Anotação dos Domínios Protéicos (ProDom)		
			# Domínio	% Identidade	*** E-value
1ª EA (1 dia após supressão da rega)					
222	AAC/CTG	234	Polyprotein retrotransposon putative protein TY3-GYPSY sub-class OSJNBB0045P24.9 GAG POL		
			PD770363	35/47 (74%)	3e-10
2ª EA (3 dias após supressão da rega)					
111-G38	ACC/CTG	258	Repeat kinase leucine-rich receptor ATP-binding nucleotide-binding serine/threonine-protein transferase receptor-like resistance PD000020		
				25/37 (67%)	2e-06
3ª EA (5 dias após supressão da rega)					
244	AAC/CTG	235	Polyprotein retrotransposon putative protein TY3-GYPSY sub-class OSJNBB0045P24.9 GAG POL		
			PD770363	35/47 (74%),	3e-10
4ª EA (10 dias após supressão da rega)					
90	ACT/CAG	275	HAT transposase dimerisation family domain transposase domain-containing OSJNBA0093E24.3 F17A8.10 T29M8.13		
			PD410187	23/34 (67%)	2e-06
92	ACT/CAG	166	Polyprotein retrotransposon protein putative transposase POL GAG-POL retroelement sub-class unclassified		
			PD529779	21/34 (61%)	2e-05
258	AAC/CTG	235	Polyprotein POL DNA GAG-POL Reverse Protease contains: H Integrase RT PD000348		
			PD770363	20/47 (42%)	8e-05
258	AAC/CTG	235	Polyprotein retrotransposon putative protein TY3-GYPSY sub-class OSJNBB0045P24.9 GAG POL		
			PD770363	35/47 (74%)	3e-10

* Resultado obtido com a submissão da sequência dos FDTs contra o banco de dados ProDom, utilizando o algoritmo BlastX.

** Foram exibidos somente os FDTs que apresentaram similaridade de sequência com o banco de dados.

*** O E-value foi usado para indicar a significância da similaridade da sequência (Altschul et al. 1997).

5.4. Receptor de Fitosulfocina: um Peptídeo Hormonal das Plantas

As cultivares tolerantes SP83-5073 e RB867515 apresentaram, respectivamente, os FDTs # 120-G44 (Tabela 10) e # 111-G38 (Tabela 11), que foram similares ao receptor quinase de fitosulfocina de arroz. Estes resultados de similaridade de sequência foram confirmados pelos domínios protéicos detectados com a submissão dos FDTs no banco de dados ProDom (Tabelas 12 e 13).

Diversos peptídeos e glicopeptídeos têm sido encontrados como uma nova classe de moléculas sinalizadoras dos vegetais durante as respostas de defesa, proliferação e expansão celular. Alguns peptídeos sinalizadores têm mostrado interagir com receptores quinases e ativam cascatas de sinalização intracelular (MOTOSE et al., 2009). A fitosulfocina (PSK), considerada um fator de crescimento presente tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas (YANG et al., 2000; UMEHARA et al., 2007), é um hormônio peptídico sulfatado que atua como sinalizador intercelular, desempenhando papel chave no processo de desdiferenciação celular. Além disso, a PSK também é requerida para a proliferação e diferenciação das células vegetais (MATSUBAYASHI et al., 2002; MORILLO & TAX, 2006; MOTOSE et al., 2009). Os efeitos da PSK na divisão celular e morfogênese têm sido relatados em várias espécies vegetais, incluindo *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana* (UMEHARA et al., 2007).

A identificação em várias espécies vegetais, de genes codificando precursores de PSK de aproximadamente 80 aminoácidos, revelou que cada pré-proteína de PSK apresenta uma sequência sinal secretora na extremidade N-terminal e a sequência da PSK próxima da extremidade C-terminal flanqueada por resíduos de aminoácido dibásico, sugerindo processamento proteolítico similar ao dos hormônios peptídicos dos animais (MOTOSE et al., 2009). Portanto, a PSK ativa é produzida por meio da sulfatação pós-traducional dos resíduos de tirosina e do processamento proteolítico (AMANO et al., 2007). As PSKs são ativas como um pentapeptídeo (PSK- α): H-Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-**Gln**-OH] ou como um tetrapeptídeo (PSK- β), que se apresenta sem a **Gln** na extremidade C-terminal. Estes compostos foram inicialmente isolados devido à habilidade de estimularem a divisão celular em culturas de embriões somáticos de *Asparagus officinalis*. Subsequentemente, compostos ativos

estruturalmente idênticos foram isolados em culturas celulares de arroz, milho, *Zinnia* e cenoura (STACEY et al., 2002).

Segundo MOTOSE et al. (2009), a PSK parece manter a atividade de cloroplastos, através da indução de genes envolvidos na síntese de clorofila e de proteínas do cloroplasto. YAMAKAWA et al. (1999) estudaram plântulas de *Arabidopsis* sob estresse térmico e observaram que a aplicação exógena da PSK- α em altas concentrações resultou no retardo da senescência. Os autores relataram que um possível papel das PSKs como fator de crescimento é aumentar a habilidade da planta para tolerar os estresses. Em seu estudo com plântulas de *Arabidopsis*, a PSK- α também auxiliou na tolerância a desidratação. No entanto, mencionam que estudos adicionais são necessários para elucidar o papel da PSK na tolerância das plantas a vários tipos de estresses.

POTTERS et al. (2007) descreveram que a resposta morfogênica induzida pelo estresse nas células vegetais poderia ser resumida em três componentes: inibição do alongamento celular, estímulo localizado de divisão celular e alterações no *status* de diferenciação celular, os quais são encontrados independentemente do tipo de estresse. Consistente com este relato, a PSK está envolvida na promoção da diferenciação celular vegetal, na organogênese e embriogênese somática, bem como na proliferação celular, regulando a atividade mitogênica (YANG et al., 2000; MATSUBAYASHI et al., 2006; PICCHI et al., 2009).

Sabe-se que a PSK se liga ao receptor de fitosulfocina (PSKR) (Figura 10), um receptor quinase contendo repetição rica em leucina (*leucine-rich repeat receptor kinase*; LRR-RK) localizado na membrana plasmática das células vegetais. A análise extensiva do receptor de fitosulfocina de *Arabidopsis* denominado *AtPSKR1*, indicou que a PSK promoveu a longevidade celular e o potencial para o crescimento (MATSUBAYASHI et al., 2006). Os receptores quinases (*receptor-like kinases*, RLKs) são proteínas de sinalização que apresentam domínio extracelular conectado por meio de domínio transmembrana à quinase citoplasmática, indicando que percebem sinais externos e o sinalizam por transdução de sinal para dentro da célula. Nos vegetais, os RLKs foram inicialmente relacionados à regulação do desenvolvimento, à resposta aos

patógenos e aos eventos de reconhecimento; mas, estudos funcionais em monocotiledôneas e dicotiledôneas têm identificados distintos RLKs que apresentam funções similares durante o desenvolvimento e os estresses abióticos (MORILLO & TAX, 2006).



Figura 10. Modelo ilustrando o receptor do hormônio peptídico fitosulfocina (PSK) de *Arabidopsis thaliana*. O receptor é membro da família de receptores quinases contendo repetição rica em leucina (LRR-RLK). O diagrama mostra o peptídeo sinal (SP); o domínio extracelular (LRRs), caracterizado por 21 cópias em *tandem*; o domínio em ilha (*Island*) de 36 aminoácidos, localizado entre o 17^o e 18^o LRR, que parece estar envolvido na ligação da molécula-ligante (PSK); o único domínio transmembrana (TM) e o domínio citoplasmático quinase serina/treonina (*Kinase domain*) (Modificado de MATSUBAYASHI et al., 2006).

A identificação de FDTs similares ao receptor de PSK, que foram expressos exclusivamente pelas cultivares tolerantes de cana-de-açúcar, sugere o possível envolvimento do fitormônio na sinalização e resposta de tolerância ao estresse hídrico.

5.5. Fator de Transcrição MADS-box

A regulação transcricional é um importante mecanismo para a reprogramação do transcriptoma em resposta à seca. Diversos genes induzidos pelos estresses abióticos, incluindo aqueles codificadores de fatores de transcrição têm sido identificados e alguns têm se mostrado essenciais para a tolerância ao estresse (LENKA et al., 2011). Na cultivar SP83-5073 foi detectado o FDT # 342 que mostrou similaridade com o fator de transcrição MADS-box 47 de milho (Tabela 10).

Os membros da família MADS-box, inicialmente identificados como genes homeóticos florais, constituem um dos grupos gênicos de fatores de transcrição mais estudados em plantas e estão envolvidos em uma ampla gama de funções no crescimento e desenvolvimento vegetal. Os fatores de transcrição MADS-box são caracterizados pela presença de domínio de ligação ao DNA de aproximadamente 60 aminoácidos, localizado na região N-terminal da proteína (ARORA et al., 2007).

LENKA et al. (2011) realizaram uma análise comparativa do transcriptoma de genótipos de arroz contrastantes para a tolerância à seca e verificaram que durante o estresse hídrico ocorreu a indução, no genótipo tolerante, do gene codificador do fator de transcrição MADS 47, que pertence a família gênica MADS-box. Do mesmo modo, ARORA et al. (2007) estudando o perfil de expressão da família gênica MADS-box em arroz durante o desenvolvimento reprodutivo e sob estresse por frio, salino e por desidratação, detectaram a expressão diferencial de alguns genes MADS-box nas três condições de estresse. O gene denominado OsMADS47 mostrou-se predominantemente expresso em tecido vegetativo e apresentou elevado nível de expressão em resposta aos três tipos de estresse abiótico.

PAGARIYA et al. (2010) estudando o perfil de expressão de transcritos em cana-de-açúcar submetida ao estresse salino, detectaram transcritos similares ao gene que codifica o fator de transcrição com domínio MADS e aos genes codificadores de proteínas relacionadas aos elementos de transposição, tais como do retrotransposon do tipo Ty3-*gypsy* e da proteína contendo o domínio de dimerização da família HAT. Em concordância com este estudo realizado com cana-de-açúcar sob estresse salino, que provoca indiretamente o estresse hídrico, no presente trabalho, as cultivares de cana-de-açúcar tolerantes à seca também exibiram FDTs diferencialmente expressos similares aos genes de elementos transponíveis, os quais serão, posteriormente, discutidos em maiores detalhes.

LEE et al. (2008) constataram que um membro da família MADS-box, denominado OsMADS26, induziu múltiplas respostas relacionadas a vários estresses e mencionaram que tal gene parece mediar a resposta ao estresse através da atividade hormonal. Os autores verificaram que a superexpressão do gene OsMADS26 em plantas transgênicas de arroz resultou na indução de genes da biossíntese de moléculas induzidas pelos estresses, tais como o jasmonato, o etileno e as espécies reativas de oxigênio (ROS) e dos prováveis genes-alvos destas moléculas envolvidos no processo relacionado ao estresse.

BASYUNI et al. (2010) estudando a planta de mangue, *Rhizophora stylosa* Griff., para a detecção dos genes relacionados a tolerância ao estresse salino, observaram a

expressão de genes em resposta ao estresse, que codificam o fator de transcrição com domínio MADS e proteínas relacionadas aos transposons, tal como a transcriptase reversa. Os autores relataram que as proteínas MADS-box já foram identificadas em insetos, nematóides, vertebrados “inferiores”, animais, leveduras e plantas. Tem sido mostrado em levedura que a proteína MADS-box ativou genes requeridos para a integridade da parede celular e para as respostas ao estresse osmótico. A sinalização associada à integridade da parede celular é induzida por diversos estresses do meio, incluindo mudanças na osmolaridade. Assim, em resposta a esse estímulo, uma proteína MAP quinase (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), pertencente à subfamília de proteínas-quinase específicas de serina/treonina, da via de sinalização integrada à parede celular ativou proteínas MADS-box por meio de fosforilações. Segundo os pesquisadores, leveduras e plantas sob condições de estresse salino podem ter um sistema de transdução de sinal comum com o envolvimento da proteína MADS-box.

Em concordância com os relatos de BASYUNI et al. (2010), foi detectado o FDT # 103 na cultivar tolerante SP83-5073, com similaridade à proteína hipotética não caracterizada de sorgo, denominada SORBIDRAFT_07g000996 (Tabela 10) que, de acordo com pesquisa realizada no banco de dados de proteína (UniProtKB) (<http://www.uniprot.org>), pertence à superfamília de proteína quinase. De acordo com anotação no *Gene Ontology* (GO), essa proteína hipotética possui funções moleculares de ligação ao ATP e de quinase serina/treonina, atuando no processo biológico de fosforilação. De igual modo, esta cultivar também apresentou o FDT # 235, com similaridade a outra proteína hipotética SORBIDRAFT_05g005800 de sorgo (Tabela 10) que, segundo anotação eletrônica no *Gene Ontology* (GO), também está relacionada ao processo biológico de fosforilação, apresentando como funções moleculares a capacidade de ligação ao ATP e ao íon cálcio e de atividade quinase serina/treonina. Tais fragmentos podem sugerir a participação das proteínas MADS-box e quinase em eventos de sinalização do estresse hídrico em cana-de-açúcar tolerante, tal como observado em leveduras.

5.6. Proteína Associada à Senescência

Ambas as cultivares tolerantes apresentaram FDTs similares a uma provável proteína associada à senescência de ervilha, sendo os de # 102-GD26 e # 109 expressos pela cv SP83-5073 (Tabela 10) e o de # 111-G39 expresso pela cv SP867515 (Tabela 11). A senescência vegetal, frequentemente induzida após a exposição aos estresses abióticos e bióticos, é um processo ativamente programado, acompanhado por mudanças nas atividades metabólicas, que envolve a degradação de macromoléculas e a remobilização de seus constituintes para outras partes da planta como sementes e folhas jovens. Durante a senescência, diversos genes coletivamente chamados de genes associados à senescência (SAGs - *senescence-associated genes*) são induzidos, incluindo genes que codificam fatores de transcrição, quinases, bem como genes codificadores de proteases e RNases (GRAFI et al., 2011).

A senescência não é necessariamente um processo terminal que leva à morte celular, mas uma fase transitória, em que é conservada a capacidade para o desenvolvimento. Conseqüentemente, sob certas circunstâncias, tais como remoção de folhas jovens ou aplicação de citocininas, folhas senescentes amareladas podem tornar-se verdes e reassumir a capacidade fotossintética. Assim, a senescência parece representar um estado transitório ímpar, que não necessariamente é definido pela expressão de genes específicos com a “marcação para a senescência”, mas pela expressão indiscriminada de genes cuja função não está completamente compreendida (GRAFI et al., 2011). De acordo com DAMRI et al. (2009), o estado transitório da senescência pode ser definido como de desdiferenciação, representado pela capacidade das células somáticas de adquirir propriedades típicas das células-tronco. As células senescentes e de protoplastos desdiferenciados têm aspectos comuns, exibindo grande aumento na expressão de genes codificadores de fatores de transcrição específicos, que são frequentemente induzidos sob várias condições de estresse abiótico e biótico (DAMRI et al., 2009).

Diversas evidências têm sustentado a hipótese de que a resposta das plantas ao estresse pode convergir na desdiferenciação celular. A primeira evidência é decorrente da redução significativa da síntese protéica em várias espécies vegetais após a

exposição às condições de estresse e, de fato, a redução da síntese de proteínas poderia facilitar a aquisição de um estado quiescente, característico das células-tronco. A segunda evidência é que a remodelação da cromatina, típico da desdiferenciação celular, é induzida após a exposição das plantas aos estresses do meio. Foram observadas mudanças no padrão de metilação do DNA genômico em *Arabidopsis thaliana* sob condições de estresse hídrico e em milho sob estresse provocado pelo frio. Finalmente, a última evidência é que alterações da expressão de diversos fatores de transcrição durante diferentes tipos de estresses, incluindo à seca, foram similares às observadas em células durante a desdiferenciação (GRAFI et al., 2011).

Tais evidências fornecem suporte para um modelo (Figura 11) no qual a resposta comum das células a certos estresses abióticos e bióticos convergiria na desdiferenciação celular por meio da qual, as células entram em um estado transitório semelhante ao da célula-tronco antes de assumir um novo destino. Dessa forma, a desdiferenciação celular precederia qualquer mudança no destino celular, quer seja rumo à transdiferenciação (conversão de um tipo celular em outro), à retomada do ciclo celular ou à morte celular programada (GRAFI et al., 2011). Tem sido observado que diferentes estresses promovem não só a desdiferenciação, mas também a indução da embriogênese somática (ZAVATTIERI et al., 2010), sendo então possível considerar a hipótese de que as respostas relacionadas ao estresse podem promover a reprogramação genômica levando a alterações substanciais na transcrição gênica, necessárias para que as células somáticas adquiram um estado embrionário (GRAFI et al., 2011).

Tendo em vista as informações citadas anteriormente, a identificação nas cultivares tolerantes SP83-5073 e RB867515, de FDTs similares à provável proteína associada à senescência (SAP - *senescence-associated protein*) e ao receptor da fitosulfocina, que também está envolvida em processos de desdiferenciação e embriogênese somática, está consistentemente relacionada às respostas das plantas aos estresses ambientais. Tais genes, portanto, podem estar contribuindo para a tolerância destas cultivares de cana-de-açúcar à seca.

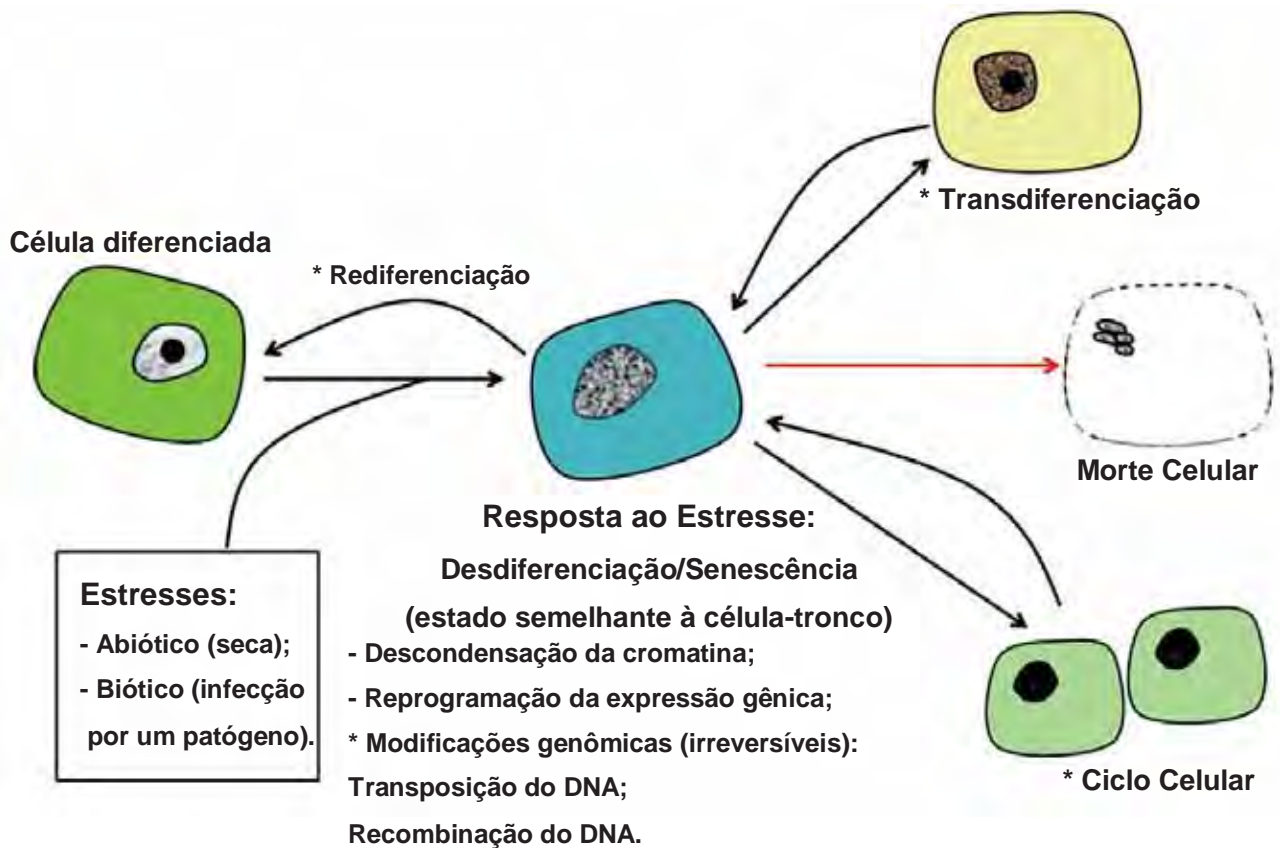


Figura 11. A resposta das plantas ao estresse depara-se com a desdiferenciação. Células foliares diferenciadas podem passar por desdiferenciação (senescência) e adquirir um estado semelhante à célula-tronco após a exposição ao estresse. A resposta celular ao estresse envolve a descondensação da cromatina, acompanhada pela reprogramação extensiva da expressão gênica (DAMRI et al., 2009). A desdiferenciação induzida pelo estresse pode levar a 'modificações genômicas' (MCCLINTOCK, 1984) devido à transposição do DNA e à recombinação, o que pode resultar em novidade genética que confira vantagem adaptativa ou em risco genético e, conseqüentemente, morte celular. Dependendo do tipo de estímulo, células desdiferenciadas podem ser induzidas a rediferenciação, a transdiferenciação ou a retomada do ciclo celular. *Muitas das células derivadas da desdiferenciação podem possuir um genótipo que não é idêntico ao genótipo da(s) célula(s) diferenciada(s) original(is) (Modificado de GRAFI et al., 2011).

5.7. Elementos de Transposição do DNA

As duas cultivares de cana-de-açúcar tolerantes à seca apresentaram FDTs similares aos elementos transponíveis (TEs - *transponibles elements*), os quais estão relacionados à modificação do genoma por meio da integração no DNA. Na cultivar tolerante SP83-5073, o FDT # 337 foi similar a *pol* poliproteína tipo *copia* do milho, enquanto o FDT # 119-G16, mostrou-se similar a proteína hipotética

SORBIDRAFT_08g021885 de sorgo (Tabela 10). Esta proteína hipotética, segundo as anotações no *Gene Ontology* (GO), está envolvida no processo biológico de integração no DNA, exibindo domínios protéicos de RNase H, integrase e transcriptase reversa. Consistente com este resultado, o FDT # 119-G16, após a submissão da sequência contra o banco de dados de domínios protéicos (ProDom) (Tabela 12), exibiu similaridade com uma provável poliproteína do retroelemento da subclasse *Ty3-gypsy*.

Já na cultivar tolerante RB867515, os FDTs # 222, # 244 e # 258 foram similares a provável proteína do retrotransposon da subclasse *Ty3-gypsy* de arroz, enquanto o FDT # 90 foi similar à proteína de dimerização, com domínio transposase da família de dimerização *hAT* de *Arabidopsis thaliana* e o FDT # 92 apresentou similaridade com a proteína hipotética VITISV_034567 de *Vitis vinifera* (Tabela 11). Essa proteína hipotética, segundo anotação eletrônica no *Gene Ontology* (GO), está envolvida no processo biológico de integração no DNA, exibindo domínios protéicos de RNase H, integrase e transcriptase reversa. Em concordância com tal anotação, o FDT # 92 exibiu similaridade com poliproteína de retrotransposon em resultado obtido da submissão da sequência contra o banco de dados de domínios protéicos (ProDom) (Tabela 13).

É reconhecido que parte do genoma seja instável, garantindo a adaptação rápida ao ambiente quando o organismo está exposto a condições que desafiam sua capacidade de sobrevivência. Associa-se à instabilidade genômica, a presença de sequências genéticas móveis ou elementos transponíveis, que possuem a capacidade de mobilização no genoma, induzindo “mutações” que podem ou não ser reversíveis. Estes TEs podem representar uma importante fonte de novidades genéticas por meio do rearranjo do genoma e/ou da estrutura de genes individuais, assim como podem interferir na regulação gênica, modificando os padrões de expressão dos genes (De FELICE et al., 2009; PEARSON et al., 2010; WOODROW et al., 2010).

A caracterização genética dos elementos transponíveis iniciou-se na década de 40, com os trabalhos de citogenética em milho desenvolvidos por Barbara McClintock. A pesquisadora definiu os TEs como elementos controladores do gene pelo fato de modularem a expressão de genes aos quais estavam associados (VAN SLUYS et al., 2001). MCCLINTOCK (1984) propôs que estes elementos poderiam ser ativados em

resposta ao estresse genômico e, com isso, permitiriam uma reestruturação do genoma. Conseqüentemente, a resposta de ativação desses elementos em células, tecidos ou organismos estressados poderia assegurar a sobrevivência em condições adversas.

Os TEs podem mover-se no genoma através de intermediários de RNA (classe I ou classe dos retrotransposons) ou de DNA (classe II ou classe dos transposons). Os retrotransposons (classe I) já foram descritos em todos os organismos, sendo os mais conhecidos os elementos *Copia* e *Gypsy* de *Drosophila* e os elementos *Ty* de levedura. Os retrotransposons podem ser separados em dois grupos, considerando a presença ou não de longas repetições terminais (LTRs). Os retrotransposons com LTRs (Figura 12) codificam todas as proteínas necessárias para a sua transposição e são subdivididos em duas classes, tendo como base a organização dos domínios protéicos semelhantes aos elementos *Ty1* e *Ty3* ou aos elementos *copia* e *gypsy*.

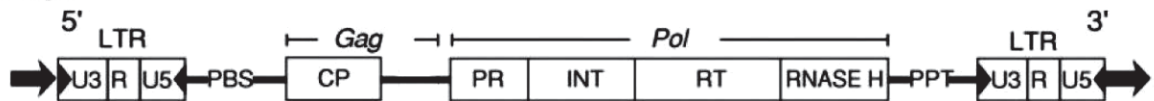
Os elementos *Ty1* e *copia* carregam dois quadros abertos de leitura (ORFs - *open reading frames*). O primeiro codifica uma proteína (*Gag*) semelhante ao capsídeo protéico viral, que contém um ou mais motivos ricos em cisteína associados com sítios de ligação de ácidos nucléicos. O segundo codifica para uma poliproteína (*Pol*) com atividade de protease (PR), envolvida na maturação de diferentes proteínas: transcriptase reversa (RT); integrase (INT); e RNaseH. O grupo *Ty1/copia* difere do grupo *Ty3/gypsy* por ter o domínio INT anterior ao domínio RT, enquanto o grupo *Ty3/gypsy* tem uma organização mais próxima à dos retrovírus (ROSSI et al., 2001; VAN SLUYS et al., 2001; TANG et al., 2005; TAPIA et al., 2005). A maioria dos FDTs encontrados nas cultivares tolerantes de cana-de-açúcar apresentou similaridade com os retrotransposons do grupo *Ty3/gypsy* de arroz, com exceção do fragmento # 337, expresso pela cv SP83-5073, que foi similar ao retrotransposon do tipo *copia* de milho.

As LTRs flanqueiam a região codificadora do elemento e são divididas em três regiões, U3, R e U5. Elas podem ser funcionalmente definidas como elementos promotores e terminadores da transcrição, pois o mRNA inicia-se na região R da LTR-5' e termina na região R da LTR-3' (Figura 12). Após a LTR-5', encontra-se o sítio de ligação do iniciador ou PBS (*Primer binding site*), similar ao tRNA da metionina. A

síntese da primeira fita de DNA normalmente é iniciada utilizando o tRNA do “hospedeiro”. Na região anterior a LTR-3’, encontra-se uma sequência de polipurinas ou PPT (*Polipurine tract*), que é o sítio do iniciador responsável pela síntese da segunda fita (VAN SLUYS et al., 2001).

Retrotransposons com LTRs

Grupo *Copia*



Grupo *Gypsy*

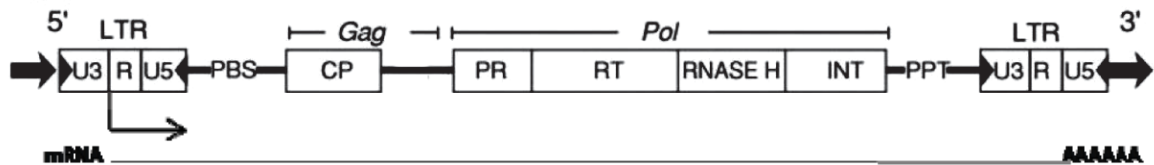


Figura 12. Estrutura dos retrotransposons com LTRs. As regiões U3, R e U5 das LTRs contêm sinais para início e término da transcrição. PBS (*Primer Binding Site*) e PPT (*Polypurine Tract*) são sítios de anelamento dos iniciadores da primeira e segunda fita do cDNA, respectivamente. CP: proteínas do capsídeo; PR: protease; RT: transcriptase reversa; RNaseH: ribonuclease H; INT: Integrase (modificado de PALHARES, 2010).

Os transposons (classe II) são elementos propagados sob a forma de DNA e exibem características estruturais comuns, apresentando nas suas extremidades sequências inversamente repetidas, denominadas IR. Tais elementos ao se inserirem em novo local do genoma promovem uma duplicação de alguns pares de bases no local da inserção e, com sua excisão desse local, podem deixar uma “cicatriz”, isto é, alguns pares de bases resultantes da duplicação promovida no momento da inserção dessas sequências. Os elementos dessa classe são divididos em famílias através da comparação das IRs, duplicação produzida no sítio de inserção e comparação de sua sequência (VAN SLUYS et al., 2001). Entre as famílias desta classe há a família *hAT*, a qual o FDT # 90, detectado na cv RB867515, foi similar.

Os TEs são muito comuns em eucariotos, entretanto, a maior parte destes elementos encontrados no complexo genoma eucariótico não está funcional devido ao

fato de serem alvos de processos de silenciamento que impedem sua proliferação no genoma ou por serem estruturalmente alterados por mutações (MELAYAH et al., 2001; WOODROW et al., 2010). Diversas evidências têm demonstrado a geração de plasticidade genética em resposta aos estresses através da mobilização de retrotransposons. Os estresses e as mudanças externas são conhecidos como sendo os principais fatores de ativação da expressão de retrotransposons em uma ampla gama de organismos, tais como leveduras, drosófila, mamíferos e em plantas (WOODROW et al., 2010).

Nas plantas superiores, os retrotransposons são muito representativos. Na maioria dos casos, eles estão presentes em alto número de cópias, representando um dos maiores componentes do genoma vegetal (VAN SLUYS et al., 2001). Em algumas Liliaceae podem representar mais de 90% do genoma (MANSOUR, 2007). Assim como nos demais eucariotos, a maioria dos retrotransposons vegetais encontra-se quiescente, sendo silenciados durante o desenvolvimento normal e tornando-se ativos devido a vários estresses abiótico e biótico, que atuam como elicitores de estresse genômico resultando na ativação destes elementos. Os transcritos de retroelementos têm sido encontrados nas plantas sob diferentes estresses (TANG et al., 2005; DE FELICE et al., 2009; WOODROW et al., 2010).

A transposição não é um processo aleatório. Em plantas, de modo geral, a expressão dos retrotransposons é fortemente controlada (VAN SLUYS et al., 2001). Tem sido mostrado que uma característica comum da maioria dos retrotransposons vegetais ativos é que eles contêm sequências *cis*-reguladoras em seu promotor na região U3 da extremidade 5'-LTR, as quais estão associadas com vias de transdução de sinal relacionadas às respostas de defesa das plantas e que se ligam a fatores de transcrição semelhantes aos induzidos pelas respostas de defesa (MANSOUR, 2007; PAGARIYA et al., 2010; WOODROW et al., 2010).

Entretanto, a atividade dos retrotransposons depende da habilidade de seus promotores em responderem às diferentes vias de sinalização que regulam a adaptação das plantas aos estresses abióticos e bióticos (WOODROW et al., 2010). A habilidade destes retroelementos em responder a uma ampla variedade de moléculas

sinais não é uma característica comum entre eles. Através da avaliação de alguns retrotransposons induzidos sob condições de estresse, ficou evidente que grupos específicos de retrotransposons são mais aptos a serem ativados pelo estresse do que outros. De fato, tem sido determinada uma alta variabilidade nas sequências de nucleotídeos e nos diferentes elementos de ação *cis* quando regiões promotoras de membros de famílias distintas de retrotransposons são comparadas. Assim, diferentes famílias de retrotransposons podem responder diferentemente aos desafios impostos por um estresse específico (MANSOUR, 2007).

QING et al. (2009) estudando a resposta de milho sob estresse salino, verificaram a indução de transcritos correspondentes aos retrotransposons. Os pesquisadores mencionam que tem sido proposto que os estresses levam a uma ampla reestruturação genômica facilitada pelos elementos de transposição e que, assim sendo, a presença destes transcritos sugere que o estresse salino possa provavelmente levar a uma reestruturação genômica em milho. Ademais, detectaram a indução de genes relacionados às SAPs (Proteínas Associadas à Senescência) e relataram que estas proteínas são responsáveis pelos processos de morte celular programada e de senescência foliar, sendo esta última, crítica para a adaptação da planta.

WOODROW et al. (2010) mostraram, em estudo realizado com tecido foliar de trigo sob os estresses salino e luminoso, que a ativação e a mobilização de um retrotransposon *Ty1-copia* que isolaram, foi controlada pelos estresses estudados, reforçando a hipótese de que a mobilização desses elementos acionada pelo estresse, possa desempenhar um papel na resposta de defesa aos estresses do meio. Relataram que a expressão desse transcrito nomeado como *Ttd1a* ocorreu apenas nas plantas crescidas sob os estresses salino e luminoso, sem qualquer expressão nas plantas-controles. Segundo os pesquisadores, em trabalho realizado com tabaco, a expressão dos retrotransposons denominados *Tnt1* e *Tto1* foi aumentada por diversos estresses abióticos. Sugerem que os elementos de transposição podem ser potentes contribuintes na estruturação do genoma e dos genes vegetais e, por conseguinte, na sua evolução e

que estes elementos podem estar envolvidos em alguns mecanismos responsáveis pela evolução molecular de genes de resistência a doenças em plantas.

HAYASHI & YOSHIDA (2009) relataram em seu estudo que, no genoma de arroz, um retrotransposon com LTR chamado *Renovator* contribuiu para a evolução do gene de resistência a ferrugem (*Pit*), que confere resistência raça-específica contra o fungo patogênico *Magnaporthe grisea*. Segundos os pesquisadores, a ativação transcricional mediada por TEs pode desempenhar um importante papel na reativação da função de genes R (Resistência) “adormecidos” no genoma vegetal. Relataram também que quando um elemento móvel se transpõe para um novo sítio, ele pode anular ou alterar o padrão de expressão da região codificadora de genes e que se sua inserção se der em regiões intergênicas pode modificar a expressão de genes adjacentes levando a mudanças na aptidão do “hospedeiro”. Exemplos de associações entre retrotransposons e genes vegetais, bem como do seu impacto na estrutura e função de genes e do potencial uso como sequência promotora têm sido mostrados. Os pesquisadores mencionaram que a informação contida na sequência do elemento transponível pode permitir a construção de carreadores naturais que agem como fortes promotores e que são capazes de modular a expressão de genes.

KIMURA et al. (2001) verificaram em aveia que um retrotransposon *Ty1-copia*, denominado OARE-1, foi intensamente expresso por ferimento, luz UV, ácidos jasmônico e salicílico, sugerindo que o mesmo é altamente sensível aos vários estímulos abióticos e bióticos e que esteja atuando nas respostas de defesa vegetal. Além disso, segundo TAPIA et al. (2005), vias de transdução de sinal dependentes e independentes de etileno foram encontradas modulando a transcrição de TLC1.1, um retrotransposon do tipo *Ty1-copia* de tomate. Em seus estudos demonstraram que a sinalização dependente de etileno parece ser a principal via de sinalização envolvida na regulação da expressão do elemento TLC1.1 e que a sua indução foi mediada por prováveis elementos reguladores ERE-box (*Ethylene-Responsive Element*) presentes na região U3.

DE FELICE et al. (2009) isolaram, em limão, um retroelemento, denominado CLCoy1, com similaridade de sequência com o domínio da transcriptase reversa do

retrotransposon tipo *Ty1-copia*. Os pesquisadores verificaram que o retrotransposon apresentou-se ativo em nível transcricional mediante o estresse salino, fermento e em cultura de células. Tal como todos os elementos móveis vegetais ativos, CLCoy1 mantém-se quiescente sob condições normais, sendo ativado pelo estresse. Propuseram que o papel deste elemento semelhante ao retrotransposon *Ty-copia*, no genoma primitivo do limão, pode ter sido o de aumentar a variabilidade e assim favorecer uma rápida adaptação em ambientes desfavoráveis, resultando em sua expansão evolutiva. Consequentemente, através da ação de seleção, apenas os arranjos epigenéticos e genéticos que promoveram a aptidão às plantas foram mantidos na população. De acordo com MANSOUR (2007), as respostas de um retrotransposon podem diferir entre os genótipos “hospedeiros” e essas especificidades que diferem sensivelmente em cada genótipo, possivelmente sejam o reflexo da resposta adaptativa de populações ancestrais aos diferentes estímulos.

WANG et al. (2011) em seu estudo com arroz sob estresse hídrico, relataram que as diferenças no padrão temporal e espacial de metilação do DNA entre uma linhagem de arroz tolerante e uma linhagem sensível podem revelar um possível papel deste mecanismo epigenético na adaptação de arroz ao estresse. Sabe-se que as plantas respondem aos estresses pelo ajustamento de sua maquinaria fisiológica e de desenvolvimento através da expressão gênica diferencial, regulando todo o seu genoma. Sob esse aspecto, pressupõe-se que mecanismos epigenéticos, tal como a metilação/desmetilação do DNA, desempenhem um papel-chave. Os autores observaram que as mudanças no padrão de metilação do DNA induzida pela seca em arroz apresentavam especificidades genotípicas, de tecido e de desenvolvimento. Em concordância com estas informações, tem sido associado o aumento do número de cópias dos retrotransposons às mudanças no padrão de metilação da citosina destes elementos (LIU & WENDEL, 2000).

Os FDTs similares aos elementos transponíveis, expressos exclusivamente pelas cultivares tolerantes SP83-5073 e RB867515, podem ser mecanismos genéticos herdados, oriundos da história evolutiva da(s) espécie(s) de cana precursora(s) destes genótipos, que contribuem para que genes relacionados à tolerância sejam induzidos

pelo estresse hídrico nestas cultivares. Caso esta hipótese seja confirmada, em estudos posteriores, a descoberta desses FDTs correspondentes à retrotransposons LTR ativos pode ser útil como marcadores genéticos para a seleção de genótipos tolerantes em programas de melhoramento da cana-de-açúcar.

5.8. Outros FDTs Expressos Exclusivamente pelas Cultivares Tolerantes de Cana-de-Açúcar

A cultivar tolerante SP83-5073 apresentou o FDT # 102-GD27, similar a provável proteína não caracterizada SORBIDRAFT_08g005000 de sorgo (Tabela 10) que, segundo pesquisa realizada no banco de dados de proteína (UniProtKB), possui domínio transmembrana encontrado em muitos transportadores de aminoácidos. Consistente com este resultado o fragmento # 102-GD27 apresentou, em pesquisa contra o banco de dados de domínios protéicos (ProDom), similaridade com a permease do transportador de aminoácidos AAP2 (Tabela 12).

Os transportadores de aminoácidos são participantes essenciais nos processos de alocação de recursos que sustentam o crescimento e desenvolvimento vegetal. O transporte de aminoácidos também desempenha um papel-chave na senescência foliar. Nos vegetais, há diferentes classes de transportadores de aminoácidos e ao menos duas superfamílias de transportadores de aminoácidos têm sido definidas: a superfamília APC (*A*mino *a*cid, *P*olyamine e *C*holine) de transporte de aminoácidos, poliamina e colina e a superfamília ATF (*A*mino *a*cid *T*ransporter *F*amily) de transporte de aminoácidos (ORTIZ-LOPEZ et al., 2000). A superfamília ATF pode ainda ser dividida em cinco subfamílias. A subfamília das permeases de aminoácidos (AAP), a subfamília dos *T*ransportadores de *L*isina-*H*istidina (LHT) e as subfamílias dos transportadores de prolina (ProTs), dos transportadores de auxinas (AUXs) e dos transportadores de aminoácidos aromáticos e neutros (ANTs). Até o momento, há oito membros conhecidos da subclasse das permeases de aminoácidos (*A*mino *A*cid *P*ermeases - AAPs), que estão bem caracterizados em *Arabidopsis thaliana* e que são nomeados de AAP1 a AAP8 (LIU & BUSH, 2006; HUNT et al., 2010).

Em plantas, os genes codificadores de transportadores de aminoácidos exibem padrões complexos de expressão, que são diferencialmente regulados em resposta a uma variedade de sinais do desenvolvimento e do ambiente (LIU & BUSH, 2006). A expressão do gene para um determinado transportador pode ser muito específica ou se sobrepor com a expressão de genes de outros transportadores (FISCHER et al., 1998).

De acordo com LIU & BUSH (2006), tem sido mostrado que o transporte de aminoácidos é altamente regulado pelos sinais do ambiente, tais como luminosidade, mudanças osmóticas e ataque de patógeno. LANG et al. (2005) detectaram, em estudo com folhas de *Citrus unshiu* em resposta à baixa temperatura, a indução do gene O37, que apresentou 52% de similaridade com o AAP2 de *Arabidopsis*. De acordo com os pesquisadores, apesar do papel exato desta proteína durante os estresses ambientais não estar claro, a indução desta permease em *C. unshiu* sugere que o metabolismo e o transporte ativo de aminoácidos são necessários sob condições de baixa temperatura. Em *Mesembryanthemum crystallinum*, uma planta halófila facultativa, foi detectada em resposta ao estresse salino, a indução da expressão do gene da AAP2 na epiderme da ponta de raízes e nas células vasculares de raízes maduras (POPOVA et al., 2003). GUO et al. (2009) compararam dois genótipos de cevada tolerantes com um genótipo sensível, submetidos ao estresse hídrico e detectaram, dentre os genes induzidos somente nos genótipos tolerantes, um que codifica a permease de aminoácidos AAP2.

O FDT # 102-GD27 expresso somente na cultivar tolerante SP83-5073, com similaridade à permease do transportador de aminoácidos AAP2, pode indicar uma possível realocação de aminoácidos resultante da degradação de proteínas observada durante o processo de senescência vegetal induzido pelos estresses ambientais, tal como a seca.

No presente trabalho foi detectado na cultivar tolerante SP83-5073, o FDT # 102-GD28, que apresentou similaridade com a enzima citosólica triose-fosfato isomerase de milho, resultado confirmado pela pesquisa no ProDom (Tabelas 10 e 12). Esta enzima atua na via glicolítica da respiração vegetal (Figura 13), realizando a interconversão das trioses fosfato: gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato (NELSON & COX, 2002).

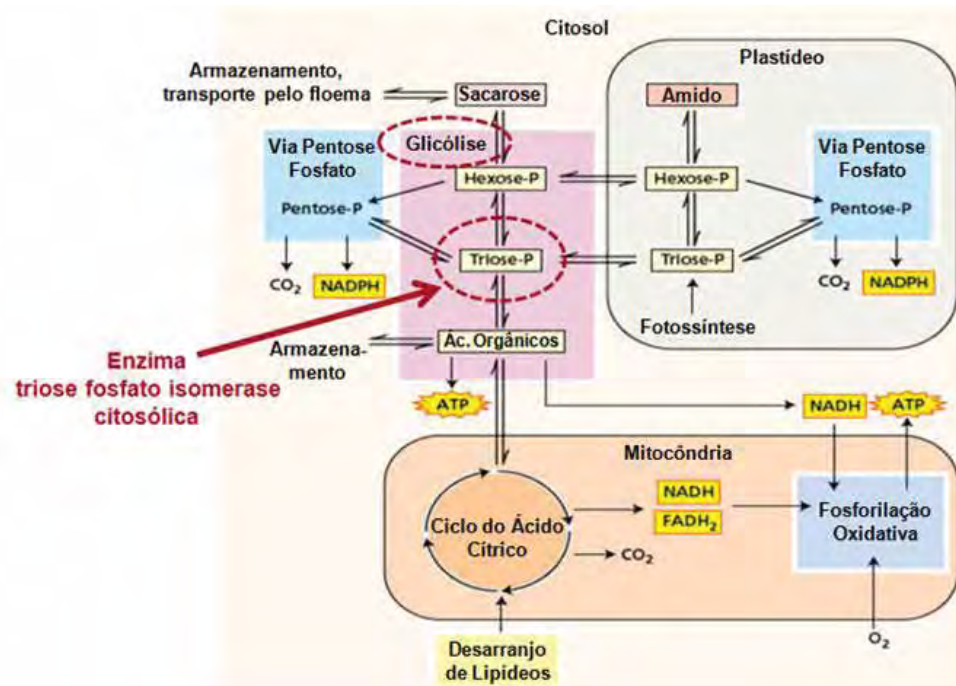


Figura 13. Visão geral da respiração vegetal. A isoforma citosólica da triose fosfato isomerase atua na via glicolítica, realizando a interconversão das trioses fosfato: gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato (Modificado de: <<http://www.fisiologiavegetal.ufc.br/Aulas%20em%20PDF/Grad%20Unidade%20VII%20-%20Respira%E7%E3o.pdf>>).

RICCARDI et al (1998) estudando as mudanças nas proteínas da folha de milho em decorrência do estresse progressivo causado pela seca, detectaram a indução da enzima citosólica triose fosfato isomerase. Também foi observada a indução da enzima triose fosfato isomerase em células de arroz cultivadas sob estresse salino (UMEDA et al., 1994). De igual modo, GORANTLA et al. (2007) estudaram um genótipo de arroz tolerante à seca e detectaram a indução do gene da triose fosfato isomerase em folha.

A cultivar tolerante SP83-5073 apresentou o FDT # 87-G22, similar ao gene da subunidade maior da enzima ADP-glicose pirofosforilase (Tabela 10). RIZHSKY et al. (2004) detectaram dentre os transcritos que foram induzidos em folhas de plantas de *Arabidopsis* submetidas simultaneamente aos estresses provocados pela seca e pelo calor, um que foi similar à ADP-glicose pirofosforilase (ADP-GlcPPase), a primeira enzima da biossíntese de amido (Figura 14).

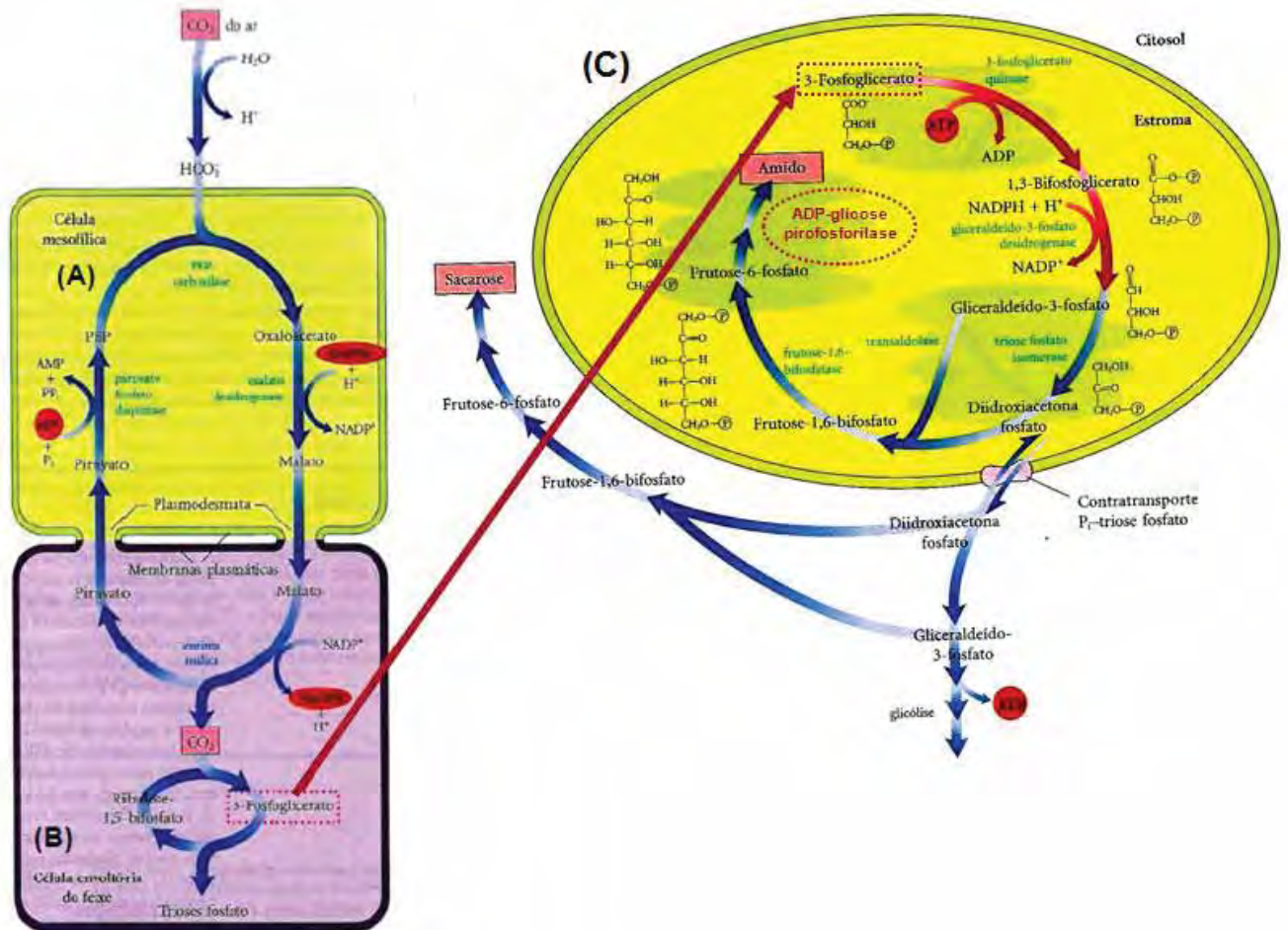


Figura 14. Biossíntese dos Carboidratos. A via C_4 envolve (A) as células mesofílicas e (B) as células envoltórias do feixe vascular. Nos vegetais C_4 , tal como a cana-de-açúcar, as células mesofílicas desenvolvem a assimilação do CO_2 pela via C_4 , mas, nas células envoltórias do feixe vascular, a (C) biossíntese do amido e da sacarose ocorre pela via C_3 (Modificado de NELSON & COX, 2002).

QUEIROZ (2010) estudando genótipos de milho, submetidos ao estresse hídrico observou que o padrão de expressão do gene codificador da ADP-Glc-PPase foi distinto entre os híbridos. No híbrido DKB 390, que se mostrou mais tolerante ao estresse hídrico, não houve alterações significativas na expressão desse gene, independentemente da disponibilidade hídrica do solo, contudo, quando o híbrido DAS 2B710, que se mostrou sensível ao estresse hídrico, foi submetido à menor disponibilidade hídrica, houve redução da expressão deste gene.

ABEBE et al. (2010) estudaram em cevada a expressão gênica, especificamente, na semente e nos órgãos fotossintéticos da espiga (lema, pálea e aresta), em resposta ao estresse hídrico e detectaram, dentre outros transcritos, o acúmulo do transcrito para a subunidade maior da enzima ADP-Glc-PPase na lema e na pálea, estruturas estas que foram consideradas, pelos pesquisadores, como as mais tolerantes ao estresse quando comparadas com a aresta (barba da espiga). WORCH et al. (2011) também estudando a expressão de genes de cevada regulada pelo estresse hídrico, detectaram a indução de vários genes associados ao metabolismo de carboidratos, incluindo o gene codificador da subunidade maior da ADP-Glc-PPase. Os pesquisadores relataram que a produção de amido em tecidos vegetativos de *Arabidopsis thaliana* tem se mostrado negativamente correlacionada com a biomassa das plantas e sugeriram que o acúmulo de amido em tecidos vegetativos interfira no crescimento da planta sob estresse hídrico.

WINGLER et al. (2000) analisaram em *Arabidopsis* o modo pelo qual a trealose, um dissacarídeo osmoprotetor, altera o metabolismo e o desenvolvimento vegetal e como ela afeta a expressão gênica mediada por açúcares. Em seus resultados constataram que a trealose induz especificamente a expressão do gene *ApL3*, que codifica uma subunidade maior da ADP-Glc-PPase. Em adição, citam que a atividade desta enzima aumentou e o amido acumulou nos tecidos-fontes, levando a um suprimento reduzido de carbono nas raízes e nas folhas em desenvolvimento.

Um dos primeiros sintomas causado pela deficiência hídrica nas plantas é a rápida inibição do crescimento devido a vários fatores, entre eles, redução da expansão celular, inibição da fotossíntese devido ao fechamento total ou parcial dos estômatos e redução na quantidade e na atividade de enzimas fotossintéticas (ABEBE et al., 2010). A interrupção do crescimento pode ser considerada como uma maneira da planta preservar os carboidratos que sustentam o metabolismo, prolongar o suprimento de energia e assim ter uma melhor recuperação após o término do estresse (FERRO, 2008). Dessa forma, é provável que as plantas mais adaptadas a deficiência de água apresentem características mais relacionadas à sobrevivência que ao crescimento. Isso porque a maioria das respostas à deficiência hídrica resulta em custo metabólico

(REVOLTI, 2010). Consistente com estes relatos, no presente estudo, a análise visual da cultivar tolerante SP83-5073 entre os dois regimes hídricos, ou seja, de adequado suprimento hídrico (controle) e de estresse hídrico (supressão da rega), sugere que a cultivar não apresentou crescimento significativo (dados não apresentados). Portanto, é possível que seu caráter de tolerância se deva principalmente a maior capacidade de sobrevivência quando comparada com a cultivar sensível SP86-155, que apresentou maior vulnerabilidade ao estresse hídrico (Figura 4).

Finalmente, nove FDTs expressos somente nas cultivares tolerantes SP83-5073 e RB867515, não apresentaram similaridade significativa com as sequências dos bancos de dados pesquisados, representando, possivelmente, genes ainda desconhecidos que podem estar desempenhando funções importantes na resposta de tolerância da cana-de-açúcar ao estresse hídrico. Os FDTs # 126 detectado na cv SP83-5073 e # 128 detectado na cv RB867515, ambos com 219 pb (Tabelas 10 e 11), provavelmente correspondem a um mesmo transcrito (Figura 15), conforme demonstrado pelo alinhamento das sequências realizado com a ferramenta ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

FDT128/Cv7515          TGATGAGTCTCTGAGTAACATCCAATCCAACCGGGGCCTAACTAGCACCTC 50
FDT126/Cv5073_REVERSO TGATGAGTCTCTGAGTAACATCCAATCCAACCGGGGCCTAACTAGCACCTC 50
*****

FDT128/Cv7515          CACCCCTCTCTGAACTACGGAGATATGTGCTGCTGTGTGGCGGGATGTGGC 100
FDT126/Cv5073_REVERSO CACCCCTCTCTGAACTACGGAGATATGTGCTGCTGTGTGGCGGGATGTGGC 100
*****

FDT128/Cv7515          CGTCGCAATGGTTGGGGCCCGCTTGTGTTGTTGTAGGTGGCCGGTCACCC 150
FDT126/Cv5073_REVERSO CGTCGCAATGGTTAGGGCCCGCTTGTGTTGTTGTAGGTGGCCGGTCACCC 150
*****

FDT128/Cv7515          TGACTTGGTAGCCTCCATGTAGGGCCGTGTTTAGATGCTCGAATTCGGGC 200
FDT126/Cv5073_REVERSO TGACTTGGTAGCCTCCATGTAGGTCCGTGTTTAGATGCTCGAATTCGGGC 200
*****

FDT128/Cv7515          CTGAATTGGTACGCACTCA 219
FDT126/Cv5073_REVERSO CTGAATTGGTACGCACTCA 219
*****

```

Figura 15. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do FDT # 126 detectado na cv SP83-5073 e do FDT # 128 detectado na cv RB867515, utilizando a ferramenta ClustalW2. O asterisco abaixo das duas sequências indica os locais com o mesmo nucleotídeo.

Um resultado semelhante foi observado ao realizar o alinhamento da sequência de nucleotídeos dos FDTs # 333 e # 339, ambos com 273 pb, detectados na cv RB867515 e da sequência dos FDTs # 334-GD13 e # 340, ambos com 164 pb, detectados na cv RB867515 (Tabela 11). Os respectivos alinhamentos sugerem que estes FDTs são idênticos (Figuras 16 e 17).

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

FDT333/Cv7515      TGATGAGTCCTGAGTAACAGGGCGTCAGTGGTTATCGGGCTGGGCCATATCGAGCACCCG 60
FDT339/Cv7515      TGATGAGTCCTGAGTAACAGGGCGTCAGTGGTTATCGGGCTGGGCCATATCGAGCACCCG 60
*****

FDT333/Cv7515      GCCAGATAATGTGTCGGCCAATGTATCACATATTTCTGTATTTATTTTTTTTACCAATGCT 120
FDT339/Cv7515      GCCAGATAATGTGTCGGCCAATGTATCACATATTTCTGTATTTATTTTTTTTACCAATGCT 120
*****

FDT333/Cv7515      TCTCTAATACATACTGTGCACATATCAGGGCCGTATCCATATTGGATACGAATCCGACAT 180
FDT339/Cv7515      TCTCTAATACATACTGTGCACATATCAGGGCCGTATCCATATTGGATACGAATCCGACAT 180
*****

FDT333/Cv7515      GGGATACAGATCCTACCACACGTATCCATGCGTCGTAGCATTATACTATGTAATTTTCCTT 240
FDT339/Cv7515      GGGATACAGACCCTACCACACGTATCCATGCGTCGTAGCATTATACTATGTAATTTTCCTT 240
*****

FDT333/Cv7515      GACCACTACTGAACTTGAATTGGTACGCAGTCA 273
FDT339/Cv7515      GACCACTACTGAACTTGAATTGGTACGCAGTCA 273
*****

```

Figura 16. Alinhamento da sequência de nucleotídeos dos FDTs # 333 e # 339 detectados na cv RB867515, utilizando a ferramenta ClustalW2. O asterisco abaixo das duas seqüências indica os locais com o mesmo nucleotídeo.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

FDT334-GD13/Cv7515  TGATGAGTCCTGAGTAACAGCCACCGTACCTCTCTGCATTCTCTTCTCTGATCCTGGCAA 60
FDT340/Cv7515       TGATGAGTCCTGAGTAACAGCCACCGTACCTCTCTGCATTCTCTTCTCTGATCCTGGCAA 60
*****

FDT334-GD13/Cv7515  CAGAACAGATTATACCTGGGCCTGCCTGCCCTGCCAGCGTCTCAGCCTCATACCGGCCA 120
FDT340/Cv7515       CAGAACAGATTATACCTGGGCCTGCCTGCCCTGCCAGCGTCTCAGCCTCATACCGGCCA 120
*****

FDT334-GD13/Cv7515  TCGCTGCTCAGTTGGTCACTTGGTCTTGAATTGGTACGCAGTCA 164
FDT340/Cv7515       TCGCTGCTCAGTTGGTCACTTGGTCTTGAATTGGTACGCAGTCA 164
*****

```

Figura 17. Alinhamento da sequência de nucleotídeos dos FDTs # 334-GD13 e # 340 detectados na cv RB867515, utilizando a ferramenta ClustalW2. O asterisco abaixo das duas seqüências indica os locais com o mesmo nucleotídeo.

De acordo com estes resultados, a expressão gênica induzida pelo estresse corresponde a genes já conhecidos e bem descritos na literatura, que codificam proteínas de sinalização, reguladoras, com funções enzimáticas ou estruturais como também a genes codificadores de proteínas com funções ainda desconhecidas (AMUDHA & BALASUBRAMANI, 2011). Sendo assim, trabalhos posteriores são necessários para caracterizar estes genes desconhecidos e para investigar o seu papel biológico nas respostas e no caráter de tolerância da cana-de-açúcar ao estresse causado pela seca.

5.9. Sequenciamento dos FDTs Remanescentes e Validação dos Resultados através da PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR).

Os próximos passos do presente estudo serão a clonagem e o sequenciamento dos demais FDTs recuperados do gel de poliacrilamida. Com isso, será possível ampliar o entendimento acerca do perfil temporal de expressão gênica durante o estresse hídrico, entre os genótipos de cana-de-açúcar tolerantes e sensível.

Além disso, será realizada a técnica de PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR) para a validação dos resultados obtidos pela técnica de cDNA-AFLP e para a compreensão do padrão de modulação destes genes entre os dois regimes hídricos estudados (com e sem rega).

VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- A análise comparativa entre genótipos de cana-de-açúcar tolerantes (SP83-5073 e RB867515) e sensível à seca (SP86-155) por meio da técnica de cDNA-AFLP é eficaz para a determinação da expressão gênica diferencial de genótipos contrastantes;
- Para o sequenciamento dos FDTs é necessário realizar anteriormente a clonagem, provavelmente, em decorrência das bandas recuperadas do gel de poliacrilamida apresentarem mais de um transcrito distinto, o que inviabiliza o sequenciamento direto;
- Os FDTs expressos exclusivamente pelas cultivares tolerantes, que foram detectados através do cDNA-AFLP, fornecem sequências candidatas que poderão ser posteriormente testadas para verificar a relação com o caráter de tolerância à seca em cana-de-açúcar.

VII. REFERÊNCIAS

ABEBE, T.; MELMAIEE, K.; BERG, V.; WISE, R. P. Drought response in the spikes of barley: gene expression in the lemma, palea, awn, and seed. **Functional and Integrative Genomics**, v. 10, p. 191–205, 2010.

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

AMANO, Y.; TSUBOUCHI, H.; SHINOHARA, H.; OGAWA, M.; MATSUBAYASHI, Y. Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 46, p. 18333–18338, 2007.

AMUDHA, J.; BALASUBRAMANI, G. Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n. 2, p. 31-58, 2011.

ANDRÉ, R. G. B.; MENDONÇA, J. C.; MARQUES, V. S.; PINHEIRO, F. M. A.; MARQUES, J. Aspectos energéticos do desenvolvimento da cana-de-açúcar. Parte 1: balanço de radiação e parâmetros derivados. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 25, n. 3, p. 375–382, 2010.

APPLIED BIOSYSTEMS — PE. **AFLP Plant Mapping Protocol**. 1997, 45p. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040959.pdf>. Acesso em: 05 março 2008.

ARORA, R.; AGARWAL, P.; RAY, S.; SINGH, A. K.; SINGH, V. P.; TYAGI, A. K.; KAPOOR, S. MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. **BMC Genomics**, v. 8, p. 242, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1186/1471-2164-8-242.

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

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.

BARBIERI, J. 30 anos do Proálcool no centro do debate. **Jornal da Unicamp**, p.11, 2005. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/ju309pg11.pdf>. Acesso em: 26 novembro 2006.

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

BASYUNI, M.; KINJO, Y.; BABA, S.; SHINZATO, N.; IWASAKI, H.; SIREGAR, E. B. M.; OKU, H. Isolation of salt stress tolerance genes from roots of mangrove plant, *Rhizophora stylosa* Griff., using PCR-based suppression subtractive hybridization. **Plant Molecular Biology Reporter**, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1007/s11105-010-0257-2.

BESSE, P.; TAYLOR, G.; CARROLL, B.; BERDING, N.; BURNER, D.; McINTYRE, C. L. Assessing genetic diversity in a sugarcane germplasm collection using an automated AFLP analysis. **Genetica**, v. 104, p. 143-153, 1998.

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.

BORRÁS-HIDALGO, O.; THOMMA, B. P. H. J.; CARMONA, E.; BORROTO, C. J.; PUJOL, M.; ARENCIBIA, A.; LOPEZ, J. Identification of sugarcane genes induced in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1115–1121, 2005.

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

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

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

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

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

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

CASAGRANDE, E. C.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; PEDROSO, J.; MARTINS, P. K.; BRETON, M. C.; NEPOMUCENO, A. L. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 168-184, 2001.

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

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar - Terceiro Levantamento (Safra 2010/2111)**. 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_09_14_50_boletim_cana_3o_lev_safra_2010_2011..pdf> Acesso em: 20 fevereiro 2011.

COPERSUCAR - Cooperativa de Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo. **Cana-de-Açúcar**. 2010. Disponível em: <http://www.copersucar.com.br/institucional/por/academia/cana_acucar.asp> Acesso em: 04 outubro 2010.

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: 23 janeiro 2011.

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

CRESTE, S.; ACCORONI, K. A. G.; PINTO, L. R.; VENCOSKY, R.; GIMENES, M. A.; XAVIER, M. A.; LANDELL, M. G. A. Genetic variability among sugarcane genotypes based on polymorphisms in sucrose metabolism and drought tolerance genes. **Euphytica**, v. 172, p. 435-446, 2010.

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.

DAMRI, M.; GRANOT, G.; BEN-MEIR, H.; AVIVI, Y.; PLASCHKES, I.; CHALIFA-CASPI, V.; WOLFSON, M.; FRAIFELD, V.; GRAFI, G. Senescing cells share common features with dedifferentiating cells. **Rejuvenation Research**, v. 12, n. 6, p. 435–443, 2009.

DE FELICE, B.; WILSON, R. R.; ARGENZIANO, C.; KAFANTARIS, I.; CONICELLA, C. A transcriptionally active *copia*-like retroelement in *Citrus limon*. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 14, p. 289-304, 2009.

DELGADO-ROJAS, J. S.; BARBIERI, V. Modelo agrometeorológico de estimativa da produtividade da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 7, n. 1, p. 67-73, 1999.

DILLEWIJN, C. **Botany of sugarcane**. Waltham: Chronica Botanica, 371p, 1952.

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.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Agroecologia da Cana-de-Açúcar**. 2011. Disponível em: <<http://www.cana.cnpm.embrapa.br/agroeco.html>>. Acesso em: 12 junho 2011.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Variedades de cana-de-açúcar**. 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html>. Acesso em: 16 fevereiro 2011.

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

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

FERRARI, F. **Caracterização Cromossômica em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*, *Poaceae*)**. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Biologia vegetal) – Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, São Paulo.

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

FISCHER, W.-N.; ANDRÉ, B.; RENTSCH, D.; KROLKIEWICZ, S.; TEGEDER, M.; BREITKREUZ, K.; FROMMER, W. B. Amino acid transport in plants. **Trends in plant science reviews**, v. 3, n. 5, p. 188-195, 1998.

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

GORANTLA, M.; BABU, P. R.; REDDY LACHAGARI, V. B.; REDDY, A. M. M.; WUSIRIKA, R.; BENNETZEN, J. L.; REDDY, A. R. Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 253–265, 2007.

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

GRAFI, G.; CHALIFA-CASPI, V.; NAGAR, T.; PLASCHKES, I.; BARAK, S.; RANSBOTYN, V. 2011. Plant response to stress meets dedifferentiation. **Planta**, v. 233, p. 433–438, 2011.

GREEN, P. **PHRAD documentation**. 1996. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>>. Acesso em: 13 março 2010.

GUO, P.; BAUM, M.; GRANDO, S.; CECCARELLI, S.; BAI, G.; LI, R.; VON KORFF, M.; VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; VALKOUN, J. Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress

during the reproductive stage. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 12, p. 3531–3544, 2009.

HAYASHI, K.; YOSHIDA, H. Refunctionalization of the ancient rice blast disease resistance gene Pit by the recruitment of a retrotransposon as a promoter. **The Plant Journal**, v. 57, p. 413–425, 2009.

HUNT, E.; GATTOLIN, S.; NEWBURY, H. J.; BALE, J. S.; TSENG, H.-M.; BARRETT, D. A.; PRITCHARD, J. A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid content of the Arabidopsis sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 1, p. 55–64, 2010.

JAYARAMAN, A.; PURANIK, S.; RAI, N. K.; VIDAPU, S.; SAHU, P. P.; LATA, C.; PRASAD, M. cDNA-AFLP Analysis Reveals Differential Gene Expression in Response to Salt Stress in Foxtail Millet (*Setaria italica* L.). **Molecular Biotechnology**, v. 40, p. 241–251, 2008.

JIANG, M.; ZHANG J. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 379, p. 2401-2410, 2002.

KACPERSKA, A. Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? **Physiologia Plantarum**, v. 122, p. 159–168, 2004.

KIMURA, Y.; TOSA, Y.; SHIMADA, S.; SOGO, R.; KUSABA, M.; SUNAGA, T.; BETSUYAKU, S.; ETO, Y.; NAKAYASHIKI, H.; MAYAMA, S. OARE-1, a Ty1-copia retrotransposon in oat activated by abiotic and biotic stress. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 12, p. 1345-1354, 2001.

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

KOSMAS, S. A.; ARGYROKASTRITIS, A.; LOUKAS, M. G.; ELIOPOULOS, E.; TSAKAS, S.; KALTSIKES, P. J. Isolation and characterization of drought-related trehalose-6-phosphate-synthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Planta**, v. 223, n. 2, p. 329-339, 2006.

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

LANG, P.; ZHANG, C.-K.; EBEL, R. C.; DANE, F.; DOZIER, W. A. Identification of cold acclimated genes in leaves of *Citrus unshiu* by mRNA differential display. **Gene**, v. 359, p. 111–118, 2005.

LEE, S.; WOO, Y.-M.; RYU, S.-II; SHIN, Y.-D.; KIM, W. T.; PARK, K. Y.; LEE, I.-J.; AN, G. Further characterization of a rice AGL12 group MADS-Box gene, OsMADS26. **Plant Physiology**, v. 147, p. 156–168, 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. Differentially expressed genes related to symbiotic association in a supernodulating soybean mutant and its wild-type. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 4, p. 235-247, 2006.

LIU, X.; BUSH, D. R. Expression and transcriptional regulation of amino acid transporters in plants. **Amino Acids**, v. 30, p. 113–120, 2006.

LIU, B.; WENDEL, J.F. Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants. **Genome**, v. 43, p. 874–880, 2000.

MANSOUR, A. Epigenetic activation of genomic retrotransposons. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 6, n. 2, p. 99-107, 2007.

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

MATSUBAYASHI, Y.; OGAWA, M.; KIHARA, H.; NIWA, M.; SAKAGAMI, Y. Disruption and overexpression of Arabidopsis phyto-sulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. **Plant Physiology**, v. 142, p. 45–53, 2006.

MATSUBAYASHI, Y.; OGAWA, M.; MORITA, A.; SAKAGAMI, Y. An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phyto-sulfokine. **Science**, v. 296, n. 1470, p. 1470-1472, 2002.

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

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

MELAYAH, D.; BONNIVARD, E.; CHALHOUB, B.; AUDEON, C.; GRANDBASTIEN, M.-A. The mobility of the tobacco Tnt1 retrotransposon correlates with its transcriptional activation by fungal factors. **The Plant Journal**, v. 28, n. 2, p. 159-168, 2001.

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

MORILLO, S. A.; TAX, F. E. Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 460–469, 2006.

MOTOSE, H.; IWAMOTO, K.; ENDO, S.; DEMURA, T.; SAKAGAMI, Y.; MATSUBAYASHI, Y.; MOORE, K. L.; FUKUDA, H. Involvement of Phytosulfokine in the Attenuation of Stress Response during the Transdifferentiation of Zinnia Mesophyll Cells into Tracheary Elements. **Plant Physiology**, v. 150, p. 437–444, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 1009p, 2002.

NOGUEIRA, F. T. S. **Identificação e Caracterização de Genes Expressos em Resposta ao Estresse por Baixa Temperatura em Cana-de-açúcar**. 2004. 127f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Vegetal e Melhoramento) – Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, São Paulo.

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

OLIVEIRA, H. F. **Avaliação de modelos de estimativa de produtividade da cana-de-açúcar irrigada em Jaíba-MG.** 2010. 96f. Dissertação (Mestrado em Meteorologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

ORLANDO FILHO, J.; MACEDO, N.; TOKESHI, H. **Seja o Doutor do seu Canavial.** ARQUIVO DO AGRÔNOMO N°6 – Encarte: INFORMAÇÕES AGRÔMICAS, n. 67, p. 1-17, 1994.

ORTIZ-LOPEZ, A.; CHANG, H.-C.; BUSH, D. R. Amino acid transporters in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1465, p. 275-280, 2000.

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

PAGARIYA, M. C.; HARIKRISHNAN, M.; KULKARNI, P. A.; DEVARUMATH, R. M.; KAWAR, P. G. Physio-biochemical analysis and transcript profiling of *Saccharum officinarum* L. submitted to salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1007/s11738-010-0676-6.

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

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

PEARSON, G. A.; HOARAU, G.; LAGO-LESTON, A.; COYER, J. A.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; HENCKEL, K.; SERRÃO, E. T. A.; CORRE, E.; OLSEN, J. L. An Expressed Sequence Tag Analysis of the Intertidal Brown Seaweeds *Fucus serratus* (L.) and *F. vesiculosus* (L.) (Heterokontophyta, Phaeophyceae) in Response to Abiotic Stressors. **Marine Biotechnology**, v. 12, p. 195–213, 2010.

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.

PICCHI, D. G.; ALTEI, W. F.; SAITO, M. S.; BOLZANI, V. S.; CILLI, E. M. Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1262-1277, 2009.

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

PMGCA – Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar. **Variedades RB de Cana-de-Açúcar**. 2008. Disponível em: <http://pmgca.dbv.cca.ufscar.br/dow/VariedadesRB_2008.pdf>. Acesso em: 16 fevereiro 2011.

POPOVA, O. V.; DIETZ, K.,-J.; GOLLDACK, D. Salt-dependent expression of a nitrate transporter and two amino acid transporter genes in *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 569–578, 2003.

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: 07 julho 2011.

POTTERS, G.; PASTERNAK, T.; GUISEZ, Y.; PALME, K. J.; JANSEN, M. Strees-induced morphogenic responses: growing out of trouble? **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 3, p. 98-105, 2007.

PRADO, R. M.; FERNANDES, F. M.; NATALE, W. Calcário e escória de siderurgia avaliados por análise foliar, acúmulo e exportação de macronutrientes em cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, v.59, n.1, p.129-135, 2002.

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

QING, D.-J.; LU, H.-F.; LI, N.; DONG, H.-T.; DONG, D.-F.; LI, Y.-Z. Comparative Profiles of Gene Expression in Leaves and Roots of Maize Seedlings under Conditions of Salt Stress and the Removal of Salt Stress. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 4, p. 889–903, 2009.

QUEIROZ, R. J. B. **Resposta fisiológica e molecular de dois genótipos de milho à limitação hídrica**. 2010. 154f. Tese (Doutorado em Agronomia – Área: Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

REBOUÇAS, N. A.; GOMES, M. D. Hibridização subtrativa seguida de PCR. Uma abordagem para identificação de genes funcionalmente relacionados com fenótipos

celulares específicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 11, p. 30-35, 1999.

REVOLTI, P. M. **Divergência genética entre clones de eucalipto por caracteres biométricos e fisiológicos sob deficiência hídrica**. 2010. 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

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

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

ROSSI, M.; ARAUJO, P. G.; VAN SLUYS, M.-A. Survey of transposable elements in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1-4, p. 147-154, 2001.

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

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

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

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

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; DA SILVA, J. A. G.; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 3, p. 193-201, 2007.

STACEY, G.; KOH, S.; GRANGER, C.; BECKER, J. M. Peptide transport in plants. **TRENDS in Plant Science**, v. 7, n. 6, p. 257-263, 2002.

SUTCLIFFE, James Frederick. **As plantas e a água**. EPU: Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1980.

TANG, Y.-M.; MA, Y.-Z.; LI, L.-C.; YE, X.-G. Identification and Characterization of Reverse Transcriptase Domain of Transcriptionally Active Retrotransposons in Wheat Genomes. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 5, p. 604–612, 2005.

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

UMEDA, M.; HARA, C.; MATSUBAYASHI, Y.; LI, H.H.; LIU, Q.; TADOKORO, F.; AOTSUKA, S.; UCHIMIYA, H. Expressed sequence tags from cultured cells of rice

(*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of genes engaged in ATP-generating pathways. **Plant Molecular Biology**, v. 25, p. 469–478, 1994.

UMEHARA, M.; IKEDA, M.; KAMADA, H. Endogenous factors that regulate plant embryogenesis: recent advances. **Japanese Journal of Plant Science**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2007.

UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. **Setor Sucroenergético – Histórico: Cultivo da Cana Hoje**. 2010. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=9E97665F-3A81-46F2-BF69-26E00C323988/>> Acesso em: 04 outubro 2010.

UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. **Cana-de-Açúcar: Origem da Atividade**. 2004. Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br/portalunica/>> Acesso em: 23 setembro 2006.

VAN SLUYS, M.-A.; SCORTECCI, K. C.; COSTA, A. P. P. O genoma instável, sequências genéticas móveis. In: Matioli, S. R. (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**, Ribeirão Preto, SP, Brazil, Holos Editora, p. 70-81, 2001.

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

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.

WACLAWOVSKY, A. J.; SATO, P. M.; LEMBKE, C. G.; MOORE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 263–276, 2010.

WANG, W.-S.; PAN, Y.-J.; ZHAO, X.-Q.; DWIVEDI, D.; ZHU, L.-H.; ALI, J.; FU, B.-Y.; KANG, Z. Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 6, p. 1951-1960, 2011.

WANG, X.; LIU, W.; CHEN, X.; TANG, C.; DONG, Y.; MA, J.; HUANG, X.; WEI, G.; HAN, Q.; HUANG, L.; KANG, Z. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 9, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1186/1471-2229-10-9.

WANG, X.; TANG, C.; ZHANG, G.; LI, Y.; WANG, C.; LIU, B.; QU, Z.; ZHAO, J.; HAN, Q.; HUANG, L.; CHEN, X.; KANG, Z. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*. **BMC Genomics**, v. 10, p. 289, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1186/1471-2164-10-289.

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

WOODROW, P.; PONTECORVO, G.; FANTACCIONE, S.; FUGGI, A.; KAFANTARIS, I.; PARISI, D.; CARILLO, P. Polymorphism of a new Ty1-*cop* retrotransposon in durum wheat under salt and light stresses. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, p. 311–322, 2010.

WORCH, S.; RAJESH, K.; HARSHAVARDHAN, V. T.; PIETSCH, C.; KORZUN, V.; KUNTZE, L.; BÖRNER, A.; WOBUS, U.; RÖDER, M. S.; SREENIVASULU, N. Haplotyping, linkage mapping and expression analysis of barley genes regulated by terminal drought stress influencing seed quality. **BMC Plant Biology**, v. 11, p. 1, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1186/1471-2229-11-1.

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

YAMAKAWA, S.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; KAMADA, H.; SATOH, S. Promotive effects of the peptidyl plant growth factor, phytosulfokine-a, on the growth and chlorophyll content of Arabidopsis seedlings under high night-time temperature conditions. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 63, n. 12, p. 2240–2243, 1999.

YANG, H.; MATSUBAYASHI, Y.; HANAI, H.; SAKAGAMI, Y. Phytosulfokine- α , a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, n. 7, p. 825-830, 2000.

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

ZAVATTIERI, M. A.; FREDERICO, A. M.; LIMA, M.; SABINO, R.; SCHMITT, B. A. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.2225/vol13-issue1-fulltext-4.