

Análise dos parâmetros biométricos, acúmulo de prolina e identificação de genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico em cana-de-açúcar, por cDNA-AFLP

Analysis of biometric parameters, proline accumulation and identification of genes involved in the response to water deficit in sugar cane by means of the cDNA-AFLP technique

Daniele Fernanda Jovino GIMENEZ^{1;2}; Gisele Cristina DEDEMO²; Juliana da Silva VANTINI²; Ana Carolina Buzinari da SILVA²; Renata Izabel Dozzi TEZZA^{2;3}; Karina Maia DABBAS²; Miguel Ângelo MUTTON⁴; Maria Inês Tiraboschi FERRO²

¹ Parte da tese da primeira autora

² Departamento de Tecnologia, FCAV-UNESP- Jaboticabal-SP-Brasil; dani.jovino@yahoo.com.br

³ CREBIO - Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica - Departamento de Tecnologia, FCAV- UNESP- Jaboticabal-SP-Brasil

⁴ Departamento de Produção Vegetal, FCAV-UNESP- Jaboticabal-SP-Brasil

Resumo

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das mais importantes culturas agrícolas, e o Brasil é considerado o maior produtor mundial de etanol. Entretanto, sua produção é diretamente influenciada pelos estresses ambientais, entre os quais o déficit hídrico. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento, por meio de análises biométricas e bioquímica, de três cultivares de cana-de-açúcar, duas tolerantes (SP83-5073 e RB86-7515) e uma sensível (SP86-155) ao estresse por déficit hídrico, e verificar a expressão gênica diferencial dependente do genótipo, utilizando a técnica de cDNA-AFLP. Em casa de vegetação, as cultivares foram submetidas a 1; 3; 5 e 10 dias de supressão da rega. Foi verificado na cultivar RB86-7515 os maiores diâmetro do colmo, matéria fresca e seca de folhas e bainha, e na cultivar SP86-155, maiores altura inicial, número de folhas e matéria fresca de colmo. O teor de prolina livre nos palmitos foi estatisticamente significativo a partir do terceiro dia de supressão da rega. Pela técnica de cDNA-AFLP, foram detectados fragmentos expressos (FEs) e fragmentos exclusivos expressos nas cultivares tolerantes (FEs-T). Com 10 combinações de *primers* seletivos EcoRI/Msel, em gel de poliacrilamida, foram observados 1.077 FEs nas cultivares tolerantes controle e sob estresse hídrico. Destes, 463 fragmentos na SP83-5073, sendo 170 fragmentos nas plantas sob estresse hídrico e 18 FEs-T. Na RB86-7515, observaram-se 614 fragmentos, onde 283 fragmentos nas plantas sob supressão da rega e 30 FEs-T. A análise comparativa do perfil de expressão revelou fragmentos de transcritos similares a Citocromo P450 de sorgo, betaglicosidase, gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e DNA helicase.

Palavras-chave adicionais: Deficiência hídrica; expressão gênica diferencial; *Saccharum* spp.

Abstract

Sugarcane (*Saccharum* spp) is one of the most important crops of the world and Brazil is the largest producer of ethanol. Its production though is directly influenced by environmental stresses among which water deficit is one of the most influential. Having that in mind, the objectives of this study were to evaluate by means of biometrical and biochemical analyses the behavior of three sugarcane cultivars – two of them (SP83-5073 and RB86-7515) considered as tolerant and one (SP86-155), as sensitive to the stress caused by water deficit and to verify the genotype dependent differential gene expression by means of the cDNA-AFLP technique. Under greenhouse conditions, the cultivars were submitted to 1, 3, 5, and 10 days without water. The cultivar RB86-7515 showed the largest culm diameter and the largest leaves and sheath fresh and dry weight. In cultivar SP86-155 the highest initial height, the largest number of leaves, and the largest culm fresh weight were found. The free proline content in the sugarcane marrow increased significantly starting on the third day of water suppression. The cDNA-AFLP technique permitted the detection of expressed fragments (Fes) and exclusive fragments expressed in the tolerant cultivars (Fes-T). With 10 combinations of selective primers, EcoRI/Msel, in polyacrylamide gel, 1,077 Fes were observed in the tolerant cultivars both in the check treatment and under water stress and 18 Fes-T. In the RB86-7515 cultivar, 614 fragments were observed from which 283 were found in the plants undergoing water suppression and 30 Fes-T. The expression profile comparative analysis showed transcript fragments similar to the P450 sorghum cytochrome, beta-glucosidase, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, and DNA helicase.

Additional keywords: Differential gene expression; *Saccharum* spp.; water deficiency.

Introdução

A cana-de-açúcar pertence à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Cyperale, família Poaceae, tribo Andropogoneae, subtribo Saccharinae e gênero *Saccharum*, de acordo com a classificação botânica descrita por Cronquist, em 1981 (SCARPARI & BEAUCLAIR, 2008). A família Poaceae é conhecida como a família das gramíneas, tais como os cereais milho, trigo, arroz e sorgo, entre outras culturas forrageiras (TZVELEV, 1989).

A cultura da cana-de-açúcar encontra-se em plena expansão no Brasil e em outras partes do mundo (FERRO, 2008), porém sua produção pode ser acometida pelos estresses ambientais, como, por exemplo, a ampliação dos períodos de seca, ocasionada pelo aquecimento global, que influencia diretamente na disponibilidade de água no solo em canaviais, reduzindo significativamente os rendimentos agrícolas (MAULE et al., 2001).

As plantas expostas à deficiência hídrica alteram seu metabolismo por meio da ativação de diferentes mecanismos de resistência, a fim de se adaptarem a esse tipo de estresse (ASHRAF & FOOLAD, 2007). Genes induzidos em condições de estresse hídrico não agem apenas protegendo as células do déficit de água através da produção de importantes proteínas, mas também participam da regulação dos genes de transdução de sinal (SHINOZAKI et al., 2003). O déficit hídrico diminui o potencial de água do solo, interferindo diretamente na eficiência de uso desta pelas plantas, as quais necessitam, então, desenvolver um potencial hídrico mais negativo que o do solo, de modo a manter o seu gradiente. 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., 2000). Esse fechamento bloqueia o influxo de CO₂ para as folhas, o que diminui o acúmulo de fotoassimilados e, por consequência, reduz a produtividade da planta (OBER & LUTERBACHER, 2002).

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

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

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

Sendo assim, no presente trabalho, analisaram-se, por meio da técnica de cDNA-AFLP, as respostas moleculares relacionadas à tolerância ao estresse por déficit hídrico em cana-de-açúcar através da comparação de três cultivares de comportamentos contrastantes, sendo duas tolerantes à seca (SP83-5073 e RB86-7515) e uma sensível (SP86-155). Avaliações bioquímicas e biométricas também foram realizadas com a finalidade de ampliar a compreensão dos mecanismos de tolerância da cultura à deficiência hídrica.

Material e métodos

Material vegetal, condições de estresse, avaliações biométricas e coleta dos palmitos

Plântulas de cana-de-açúcar classificadas como tolerantes (SP83-5073 e RB86-7515) (EMBRAPA, 2011) e sensíveis (SP86-155) ao déficit hídrico no solo foram utilizadas no presente trabalho. A cultivar sensível foi avaliada através de experimentos em campo e classificada quanto à sua produtividade em períodos prolongados de seca (COPERSUCAR, 1999; CTC, 2007). As cultivares foram cedidas pela Fazenda Santa Rita, localizada no município de Barrinha - SP. O experimento foi realizado em casa de vegetação e, durante o período experimental, as temperaturas médias das máximas e das mínimas foram de 31,00 °C ± 2,38 °C e 22,19 °C ± 1,94 °C, respectivamente, e a umidade relativa média do ar foi de 60,44 ± 17,44 %. As plantas de cana-de-açúcar foram obtidas por meio de brotação de minitoletes (6,5 e 7,5 cm de comprimento), contendo uma única gema, provenientes de soca de viveiro. Após o tratamento com fungicida sistêmico Priori Xtra® Syngenta (25 mL do fungicida para cada 10 L de água de torneira), de 14 a 16 minitoletes foram distribuídos em bandeja de plástico (30 cm x 20 cm x 10 cm) coberta com areia peneirada e umedecida posteriormente. Aos 35 dias após o plantio (DAP) para a

cv SP83-5073, aos 36 DAP para a cv RB86-7515 e aos 24 DAP para a cv SP86-155, foram selecionadas as plântulas com base no desenvolvimento da parte aérea e das raízes e então transplantadas para vasos de plástico de 14,5 L (uma plântula por vaso). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados e em arranjo fatorial, constituindo-se de três genótipos de cana-de-açúcar, quatro replicatas biológicas para cada planta-controle e tratada, e quatro épocas de coleta. A rega foi realizada diariamente de modo a manter a umidade do solo na faixa de 65-75% da capacidade de campo, e a umidade do solo foi determinada por pesagem, ao acaso, de vasos dentro dos blocos. Aos 186 DAP da cv SP83-5073 e aos 175 DAP da cv RB86-7515 e da cv SP86-155, iniciaram-se os tratamentos de supressão da rega por 1; 3; 5 e 10 dias, sendo que as plantas-controle foram mantidas com irrigação diária. No dia anterior a cada época de coleta, foram realizadas avaliações biométricas no conjunto de plantas selecionadas (plantas-controle e submetidas à supressão da rega) das três cultivares de cana-de-açúcar. As análises biométricas analisadas foram: altura inicial e final das plantas, diâmetro do colmo, número de folhas, matéria fresca de folhas-bainhas e colmos, e matéria seca (determinada por pesagem após secagem do material vegetal em estufa de circulação forçada de ar, a 70 °C durante 72 horas) de folhas-bainhas e colmos.

Após cada período de supressão de rega, conforme os tratamentos, amostras de palmitos de cana-de-açúcar das plantas-controle e das plantas submetidas ao déficit hídrico foram coletadas, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas em freezer a -80 °C até o momento da sua utilização para a realização do experimento de cDNA-AFLP.

Determinação do teor de prolina livre

A determinação dos teores de prolina livre nas amostras de palmito foi feita com o método do ácido sulfossilicílico descrito por BATES et al. (1973). Foi utilizado o tolueno como branco, e as leituras foram realizadas no espectrofotômetro *Pharmacia Ultrospect III*, com comprimento de ondas de 520 nm, em que a intensidade da cor do cromógeno foi proporcional à concentração de prolina presente na solução em análise. Os teores de prolina livre nos palmitos foram calculados com base na massa fresca, segundo a fórmula: $[(\mu\text{g prolina mL}^{-1} \times \text{mL tolueno})/115,5 \mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1}] / [(g amostra)/5] = \mu\text{mol de prolina g}^{-1}$ massa fresca de palmito. Cada repetição (amostra) foi representada por um extrato simples, dosado em triplicatas.

Análise Estatística

A análise estatística dos dados provenientes das avaliações biométricas foi realizada

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

Extração de RNA total e síntese do cDNA dupla fita

O RNA total foi extraído a partir de um pool de amostras de palmito constituído por quantidades iguais de cada replicata, amostradas nos quatro pontos de coleta, utilizando-se do kit comercial *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. Para verificar a quantidade e a pureza do RNA extraído, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific Inc.). A integridade dos RNAs foi verificada em gel de agarose desnaturante a 1,5 % (m/v), contendo 6,7 % de formaldeído (v/v).

A primeira fita de cDNA foi sintetizada, utilizando o *Revertaid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante, e a segunda fita de cDNA foi sintetizada, utilizando DNA Polimerase I (Fermentas) e RNase H (Invitrogen).

Técnica de cDNA-AFLP

Esta técnica foi realizada utilizando o *kit AFLP@ Plant Mapping (Regular Plant Genomes) da PE-Applied Biosystems, Inc., CA, USA, 1997*, conforme as instruções do fabricante, com algumas modificações.

- Reação de restrição: a reação de restrição foi feita com a digestão do cDNA, por meio de duas enzimas de restrição: *EcoRI* de corte raro e *MseI* de corte frequente, que geraram fragmentos com extremidades compatíveis para a posterior ligação dos adaptadores *EcoRI* e *MseI*. As amostras foram mantidas em termociclador a 37 °C, por 2 horas, seguidas de 15 minutos a 70 °C para a inativação das enzimas;

- Reação de ligação dos pares de adaptadores: antes de iniciar a reação de ligação, coletaram-se, em um novo tubo, uma alíquota dos adaptadores das enzimas de restrição *EcoRI* e uma da *MseI* e foram aquecidas, separadamente, a 95 °C, por 5 minutos, e então resfriadas à temperatura ambiente por um período superior a 10 minutos. Em seguida, os dois adaptadores foram adicionados em um único tubo para posterior utilização. As reações de ligação foram mantidas a 20 °C, por 2 horas, em termociclador e, após, diluídas três vezes em TE (20 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA, pH 8,0);

- Reação de amplificação pré-seletiva: a pré-amplificação foi realizada, utilizando-se de 4 µL dos produtos de ligação diluídos três vezes e *primers* correspondentes aos adaptadores. O

termociclador foi programado com as seguintes condições: 72 °C por 2 minutos, 20 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e uma extensão final de 60 °C por 30 minutos.

- Reação de amplificação seletiva: ao analisar as combinações de *primers* mais polimórficas (dados não apresentados), ou seja, presença de bandas nas amostras de cana-de-açúcar tolerantes, desde que ausente nas amostras de cana sensível (análise qualitativa), foram utilizadas, 12 combinações de *primers* *EcoRI* e *MseI* (Tabela 1). Para a realização da reação de amplificação seletiva, foram utilizados 2,0 µL do produto da reação de amplificação pré-seletiva das três cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico, nas quatro épocas de coleta estudadas, e suas respectivas plantas-controle. A PCR seletiva consistiu em 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.

Tabela 1 - Doze combinações de *primers* utilizados na técnica de cDNA-AFLP. *Twelve primer combinations used in the cDNA-AFLP technique.*

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

^(*) Em negrito, os dois nucleotídeos adicionais dos *primers* seletivos.

Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% (7 M ureia) corado com nitrato de prata

As amostras da amplificação seletiva das 12 combinações foram aplicadas em seis géis de poliacrilamida a 6% de desnaturante, contendo 7,0 M de ureia. Foi aplicada uma alíquota de 3,7 µL destas amostras, juntamente com a aplicação de alíquotas dos marcadores de peso molecular de 10; 20 e 50 pb (Fermentas), previamente desnaturados com tampão formamida. As amostras foram preparadas por meio da adição de tampão de formamida (10 mM NaOH; 0,05 % de xilenocianol (m/v); 0,05% de azul de bromofenol (m/v); 20 mM EDTA em formamida) na razão de 1:0,5. As amostras foram desnatura-

das em termociclador, a 95 °C, por 5 minutos, e imediatamente colocadas no gelo até a aplicação no gel. A corrida foi realizada a 55 W, em tampão TBE 1 X, por aproximadamente 3 horas e a temperatura da placa ficou entre 50 e 55 °C. A coloração das placas foi realizada de acordo com o protocolo descrito por CRESTE et al. (2001).

Isolamento dos fragmentos de cDNA e sequenciamento

Os produtos de amplificação seletiva foram separados em gel de poliacrilamida a 6 %, corados com prata de acordo com CRESTE et al. (2001). Os géis contendo as combinações foram analisados em transiluminador de luz branca, onde foram considerados fragmentos exclusivos - FEs-T- os fragmentos expressos apenas nas cultivares tolerantes, submetidos a supressão da rega e ausentes em suas plantas-controle, e considerados fragmentos exclusivos - FEs – aqueles que não foram visualizados em suas respectivas plantas-controle. Antes de se realizar a extração dos fragmentos, fez-se a estimativa de seus pesos moleculares por meio da equação de regressão linear, baseando-se na migração dos padrões de tamanho molecular utilizados. Tal método trata-se de uma extrapolação e, portanto, os valores estimados de tamanho molecular não são precisos. De qualquer forma, o método revelou-se de grande eficácia para a estimativa do tamanho dos fragmentos, visto que o valor estimado apresentou, para os FEs-T, correspondência com o tamanho molecular determinado pelo posterior sequenciamento dos fragmentos. Logo após, os géis foram imersos em uma bandeja com água destilada, e com o auxílio de uma lâmina de bisturi, os pedaços de géis contendo os fragmentos foram colocados em tubos de microcentrifuga contendo 50 µL de tampão TE (20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) e estocados a 4 °C, por 16 horas. Para a eluição do DNA, os tubos contendo os FEs foram colocados no termociclador a 60 °C, por 2 horas, seguidos de três ciclos de congela/descongela, conforme descrito por PATHAN et al. (2007). Uma alíquota de 10 µL foi utilizada para a reamplificação com as mesmas condições utilizadas na condição de reação, utilizadas anteriormente na amplificação seletiva. Produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit *Wizard SV Gel ANd PCR Clean-Up System* (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota da amostra contendo 75 ng de DNA foi inserida no vetor pGEM – T Easy Vector System (Promega), numa razão molar de 3:1. Para a obtenção de plasmídeos recombinantes, foi utilizado o método de transformação de células de *Escherichia coli* (cepa DH10B) quimicamente competentes. A extração e a purificação dos plasmídeos recombinantes foram feitas, utilizan-

do-se do kit *Ready-to-use systems for fast purification of nucleic acids* (Macherey-Nagel), de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento dos fragmentos foi realizado segundo o método de terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER et al., 1977), utilizando a química do *Big Dye Terminator da Applied Biosystems* (ABI), de acordo com as instruções do fabricante em sequenciador automático de DNA *Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer* (PE-Applied Biosystems, Inc., CA, USA). As sequências obtidas foram analisadas pelos programas *Phred* (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998), *Phrap* (GREEN, 1996) e *cross_match* (EWING & GREEN, 1998) para verificar a qualidade das bases e remover as sequências de nucleotídeos correspondentes ao vetor de clonagem. Posteriormente, foram submetidas a pesquisas no banco de dados, utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990) contra o banco NR, para a identificação de similaridades com sequências de proteínas já

descritas na base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Resultados e discussão

Avaliações biométricas

Na análise estatística dos parâmetros de crescimento, foi verificado que o estresse hídrico sofrido pelas três cultivares de cana-de-açúcar (SP83-5073, RB86-7515 e SP86-155), submetidas a 1; 3; 5 e 10 dias de supressão da rega, provocou diferenças estatisticamente significativas em todos os parâmetros analisados nos fatores: estresse, cultivar, coleta e nas interações estresse x coleta. No entanto, para as interações estresse x cultivar, cultivar x coleta e estresse x cultivar x coleta, não foi observada diferença significativa, a 5 % de probabilidade, pelo teste F, para nenhum parâmetro estudado, provavelmente devido ao curto tempo de supressão da rega sofrido pelas plantas (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para os parâmetros analisados das cultivares de cana-de-açúcar SP86-5073, RB86-7515 e SP83-155, em casa de vegetação e submetidas a 1; 3; 5 e 10 dias de supressão da rega. *Resumé of the analysis of variance of evaluated parameters of the sugarcane cultivars SP86-5073, RB86-7515, and SP83-155 grown under greenhouse conditions and submitted to 1, 3, 5, and 10 days of water suppression.*

Fatores	Valores de F								
	¹ AIP	² AFP	³ D _{AIF}	⁴ NF	⁵ DC	⁶ MFFB	⁷ MFC	⁸ MSFB	⁹ MSC
Estresse (E)	0,03 ^{NS}	2,86+	8,52*	6,27**	0,04 ^{NS}	33,91***	1,01 ^{NS}	1,94 ^{NS}	1,52 ^{NS}
Cultivar (C)	161,32***	130,04***	2,93+	66,18***	44,89***	32,36***	2,29+	26,57***	2,22 ^{NS}
Coleta (Co)	2,78**	2,55+	4,67*	0,55 ^{NS}	0,64 ^{NS}	16,43***	1,73 ^{NS}	1,71 ^{NS}	4,52**
E x C	0,01 ^{NS}	0,75 ^{NS}	1,04 ^{NS}	1,12 ^{NS}	0,13 ^{NS}	0,85 ^{NS}	0,66 ^{NS}	0,36 ^{NS}	0,18 ^{NS}
E x Co	0,01 ^{NS}	0,44 ^{NS}	1,05 ^{NS}	0,95 ^{NS}	0,77 ^{NS}	28,83***	0,89 ^{NS}	1,83 ^{NS}	0,64 ^{NS}
C x Co	1,65 ^{NS}	0,60 ^{NS}	1,07 ^{NS}	1,52 ^{NS}	0,64 ^{NS}	0,53 ^{NS}	0,46 ^{NS}	0,65 ^{NS}	0,62 ^{NS}
E x C x Co	0,01 ^{NS}	0,30 ^{NS}	1,02 ^{NS}	0,33 ^{NS}	1,46 ^{NS}	1,27 ^{NS}	0,40 ^{NS}	0,67 ^{NS}	0,31 ^{NS}
¹⁰ CV (%)	9,04	9,31	47,89	9,67	7,73	14,87	22,80	14,09	27,16

¹AIP - Altura inicial das plantas (cm); ²AFP - Altura final das plantas; ³DAIF - Diferença entre AIP e AFP (cm); ⁴NF - Número de folhas; ⁵DC - Diâmetro do colmo; ⁶MFFB - Matéria fresca de folhas mais bainhas; ⁷MFC - Matéria fresca de colmos; ⁸MSFB - Matéria seca de folhas mais bainhas e ⁹MSC - Matéria seca de colmos; ^{NS} - Não significativo pelo teste F; *** - Significativo (p<0,001) pelo teste F; ** - Significativo (p<0,01) pelo teste F; * - Significativo (p<0,05) pelo teste F; + - Significativo (p<0,10) pelo teste F; ¹⁰CV - coeficiente de variação.

Para o parâmetro Altura Inicial das Plantas (AIP) e Altura Final das Plantas (AFP), a maior média foi encontrada na SP86-155, e a menor na RB86-7515 para a AIP. Do mesmo modo, para a AFP, as duas cultivares, após 10 dias de supressão da rega, não reduziram seu crescimento, ou seja, continuaram crescendo e mantiveram a maior média e a menor média para as SP86-155 e RB86-7515, embora ambas sejam de maturação precoce-tardia, respectivamente (EMBRAPA, 2011). Esse aumento no crescimento está relacionado, diretamente, com o aumento na altura final das plantas, estando de acordo com os resultados obtidos por MACHADO et al.

(2009) que, ao avaliarem as respostas de dois genótipos de cana-de-açúcar, em três fases distintas, verificaram que o genótipo IACSP 94-2094 foi o menos afetado pela falta de água e manteve o crescimento, enquanto o IACSP 96-2042 apresentou menor crescimento da planta e, ao comparar a altura dos dois genótipos, sugeriram que a IACSP 94-2094 possa ser tolerante, e a IACSP 96-2042, sensível ao estresse hídrico. SILVA et al. (2008), trabalhando com quatro famílias de cana-de-açúcar sob condições de déficit hídrico, observaram que é possível considerar a variável altura da planta como um dos indicadores de tolerância ao estresse hídrico.

Nesse trabalho, deve-se levar em consideração se as cultivares estudadas diferem em seu padrão de crescimento, antes de serem submetidas à supressão de rega, provavelmente devido às suas características genótípicas.

Com relação ao parâmetro número de folhas (NF), ao comparar as médias entre as plantas-controle e submetidas ao estresse hídrico (Figura 1A), foi observada a menor média nas plantas sob estresse hídrico em relação às plantas-controle (sem supressão da rega). O mesmo foi observado por SMIT & SINGELS (2006) que, trabalhando com duas cultivares de cana-de-açúcar (NCo3676 e N22) submetidas à supressão da rega, verificaram que, simultaneamente, ocorreu uma redução do número de folhas verdes e um aumento da taxa de senescência foliar em ambas as cultivares, após 38

dias de seca. O mesmo foi observado nesse experimento com 10 dias de déficit hídrico. De acordo com TAIZ & ZEIGER (2004), em condições de deficiência hídrica, o estresse limita não apenas o tamanho, mas também o número de folhas. A menor média para o número de folhas foi encontrada na cultivar tolerante, RB86-7515, contrastando com a cv SP86-155, sensível ao estresse hídrico (Figura 1B). Esse resultado corrobora os resultados obtidos por CARLIN & SANTOS (2009), ao constatarem que a deficiência hídrica reduziu o número de folhas em 34,2% nos três tratamentos de disponibilidade hídrica, em plantas jovens de cana-de-açúcar resistentes à seca. Desta maneira, foi verificado que a média do número de folhas foi maior na cultivar sensível ao déficit hídrico durante todo o período de coleta.

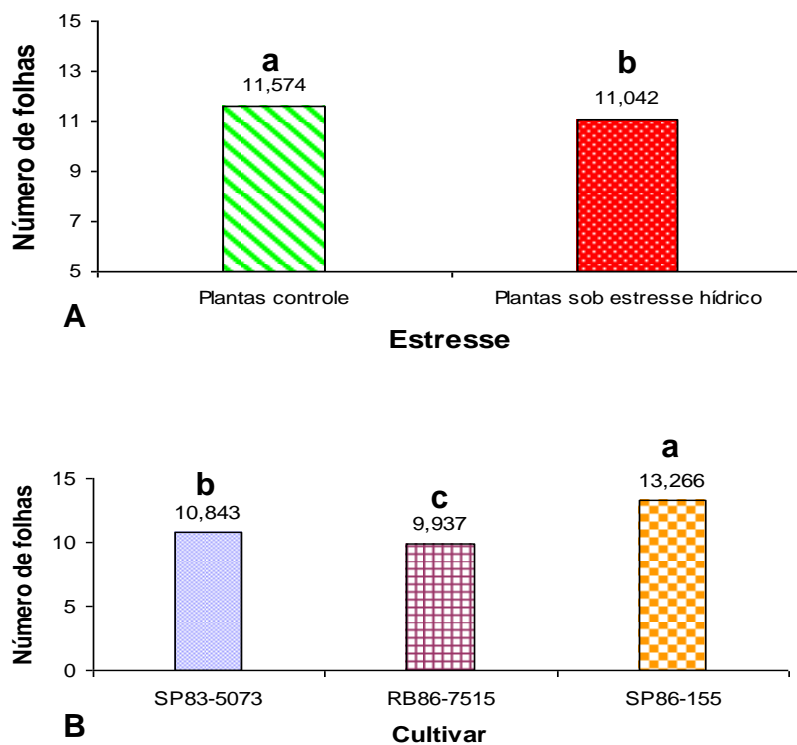


Figura 1 - Número de folhas em função do estresse hídrico (A) e da cultivar (B). Médias seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. *Number of leaves due to water stress (A) and cultivar (B). Means followed by different lower case letters differ by Tukey test at 5 % of probability.*

Foi observada, para diâmetro do colmo, diferença significativa promovida pelo fator cultivar, onde a RB86-7515 se destaca das outras cultivares com a maior média, e as outras não diferiram entre si. De acordo com SILVA et al. (2008), ao observarem algumas famílias de cana-de-açúcar que obtiveram maiores valores de diâmetro, número e altura de colmos, sob condições de estresse hídrico, concluíram que essas

características podem ser consideradas como ferramentas úteis durante o processo de melhoramento genético de plantas. Desta maneira, o aumento do diâmetro do colmo na cultivar RB86-7515, obtido em nosso experimento, confirma sua característica de tolerância à seca.

Analisando o fator cultivar para o parâmetro matéria fresca de folhas-bainhas, a cultivar RB86-7515 obteve a maior média entre

as cultivares, e a menor média foi encontrada na cv SP83-155 (Figura 2A). GUIMARÃES (2007), estudando a resistência varietal da cana-de-açúcar a *M. fimbriolata*, em três genótipos, verificou que a massa fresca foi superior na cultivar tolerante ao estresse biótico. Com relação ao fator estresse, as plantas-controle obtiveram a maior média significativa em relação às plantas sob supressão da rega. Para o fator coleta, houve uma redução significativa na média a partir da 3ª coleta (Figura 2B). Esse resultado é esperado em experimento de supressão da rega, sugerindo que as plantas durante o período de déficit hídrico, podem ser afetadas negativamente em vários processos fisiológicos, sobretudo levar à redução na eficiência do uso da água na fotossíntese (INMAN-BAMBER, 2004).

Com relação ao fator estresse, as plantas-controle obtiveram a maior média significativa em relação às plantas sob supressão da rega (Figura 3A). Na Figura 3B, pode-se verificar que a RB86-7515 se destaca com maior média em relação às outras cultivares, e o contrário foi observado na SP86-155. Entre as épocas de

coleta, podemos observar que a RB86-7515 se mantém com as maiores médias até à 3ª época de coleta, ocorrendo redução significativa na 4ª coleta. Essa redução também foi significativa para as outras cultivares. Na 2ª e na 3ª épocas de coleta, as três cultivares mantiveram estatisticamente as mesmas médias.

Para a matéria fresca de colmo, a melhor média foi verificada na cv SP86-155, e a cv RB86-7515 apresentou média intermediária, não diferindo estatisticamente das outras cultivares (Figura 4).

Com relação à matéria seca de folhas e bainhas, foi verificada a maior média na RB86-7515, e as outras cultivares não diferenciaram entre si para o fator cultivar (Figura 5). Esses resultados estão de acordo com o obtido por MACHADO et al. (2009), ao verificarem que o clone IACSP 96-2042 foi o mais afetado pelo déficit, devido ao menor acúmulo de matéria seca no colmo sob baixa disponibilidade hídrica, na fase inicial de crescimento das plantas.

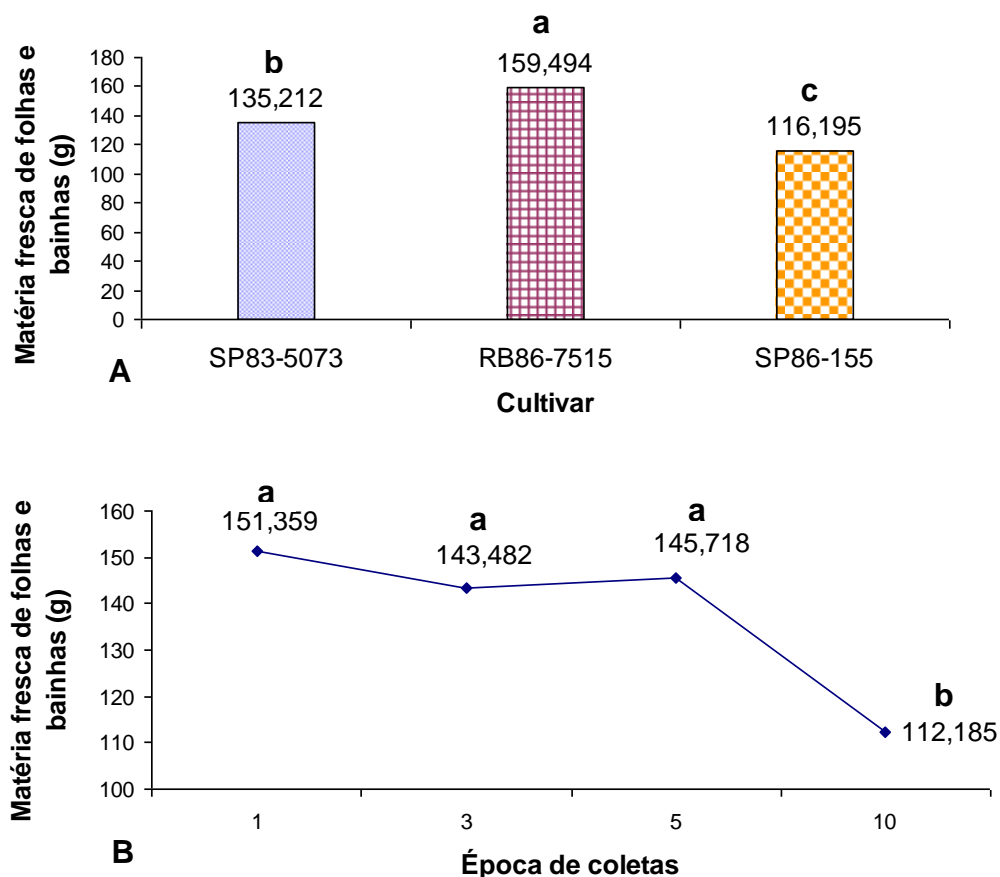


Figura 2 - Matéria fresca de folhas e bainhas em função da cultivar (A) e da época de coleta (B). Médias seguidas por diferentes letras minúsculas, em cada figura, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. *Leaf and sheath fresh weight as influenced by cultivar (A) and harvest time (B). Means followed by different lower case letters are statistically different at the level of 5% of probability, according to Tukey's test.*

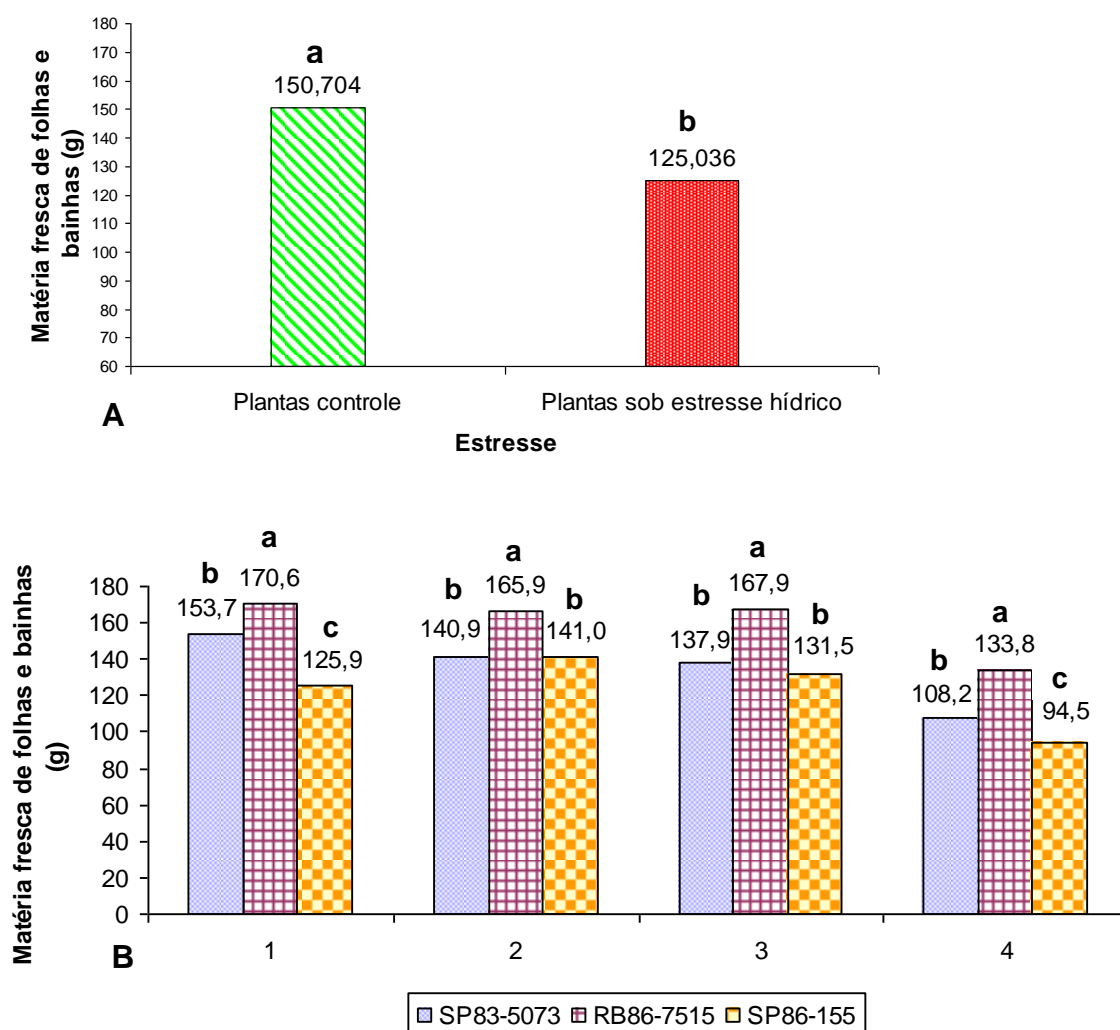


Figura 3 - Matéria fresca de folhas e bainhas em função do déficit hídrico (A) e da interação cultivar x coleta (B). Médias seguidas por diferentes letras minúsculas em cada tratamento de cada figura diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. *Leaf and sheath fresh weight as influenced by water deficit (A) and the interaction of cultivar and harvest time factors (B). Means in each figure followed by the same small lower case letter are not statistically different at the level of 5% of probability, according to Tukey's test.*

Para o parâmetro matéria seca de colmo, foi verificada diferença significativa ocasionada na 4ª coleta (Figura 6). Esses resultados estão de acordo com o obtido por OLIVEIRA et al. (2007) que, ao avaliarem o desenvolvimento da área foliar de três cultivares de cana-de-açúcar, em condições de campo, para a produção de biomassa, verificaram que, na fase final do experimento (497 DAP), o acúmulo de massa seca nas folhas manteve-se mais constante, enquanto o acúmulo de massa seca nos colmos resultou em taxas maiores.

Determinação do teor de prolina livre

Para a determinação do teor de prolina livre, as análises estatísticas foram separadas por épocas de coleta. Para a 2ª época de coleta,

o teor de prolina livre foi significativo apenas para o fator cultivar, em que as maiores médias foram verificadas nas cv SP83-5073 e SP86-155 (Figura 7A). Esse resultado corrobora o obtido por GONÇALVES (2008) que, estudando quatro variedades de cana-de-açúcar sob condições de estresse hídrico, em casa de vegetação, observou que a cultivar SP79-1011, considerada tolerante à seca, apresentou maiores valores de prolina.

Para o fator cultivar, na 3ª época de coleta, o teor de prolina livre foi significativo em todos os fatores, sendo que a SP86-155, sensível ao estresse hídrico, se destaca com a maior média, e as outras cultivares não se diferenciaram (Figura 7B).

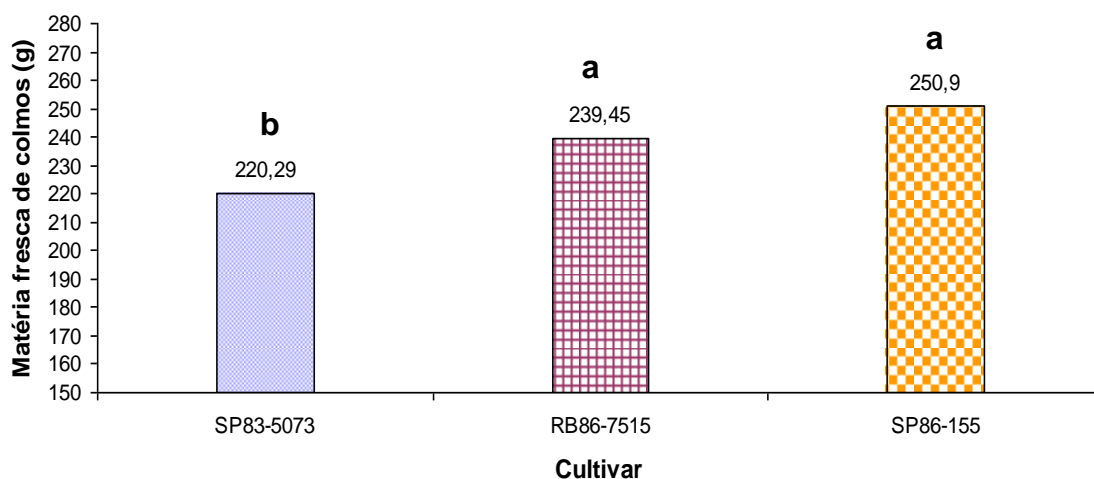


Figura 4 - Efeito do fator cultivar sobre o parâmetro matéria fresca de colmo. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. *Cultivar factor effect on culm fresh weight. Means followed by the same small lower case letter are not statistically different at the level of 5% of probability, according to Tukey’s test.*

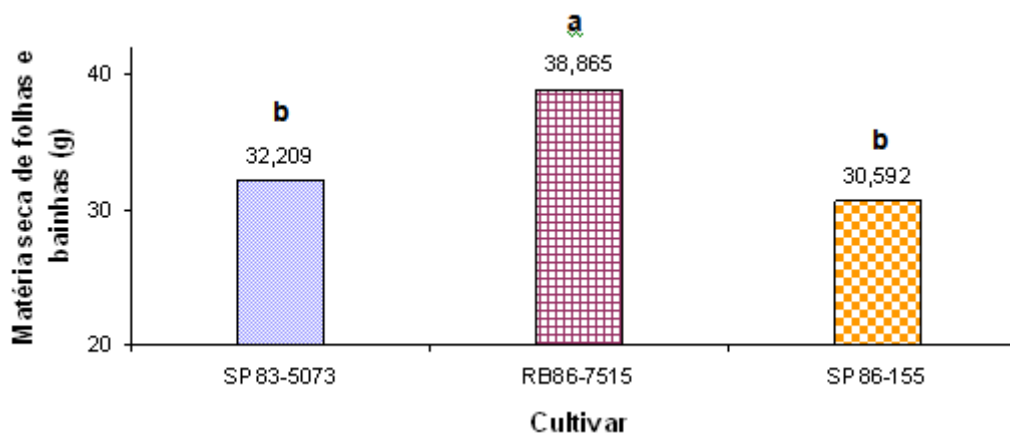


Figura 5 - Matéria seca de folhas e bainhas em função da cultivar. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. *Leaf and sheath dry weight as influenced by cultivar. Means followed by the same lower case letter are not statistically significant at the level of 5% of probability, according to Tukey’s test.*

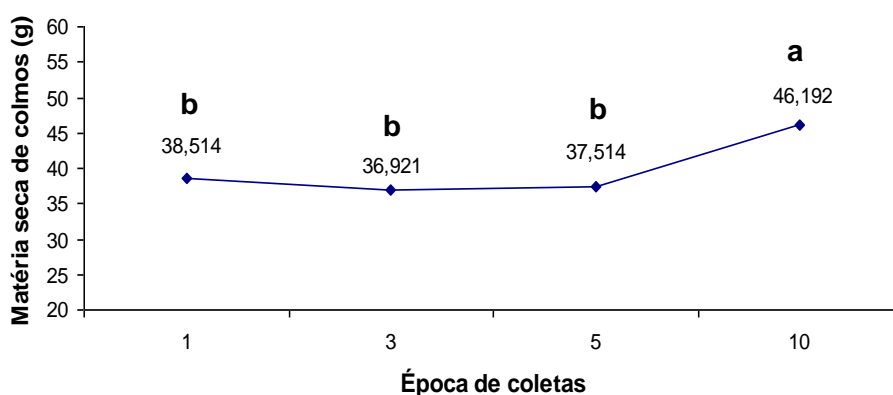


Figura 6 - Matéria seca de colmos em função da época de coleta. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. *Culm dry weight as influenced by harvest time. Means followed by the same lower case letters are not statistically different at the level of 5% of probability, according to Tukey’s test.*

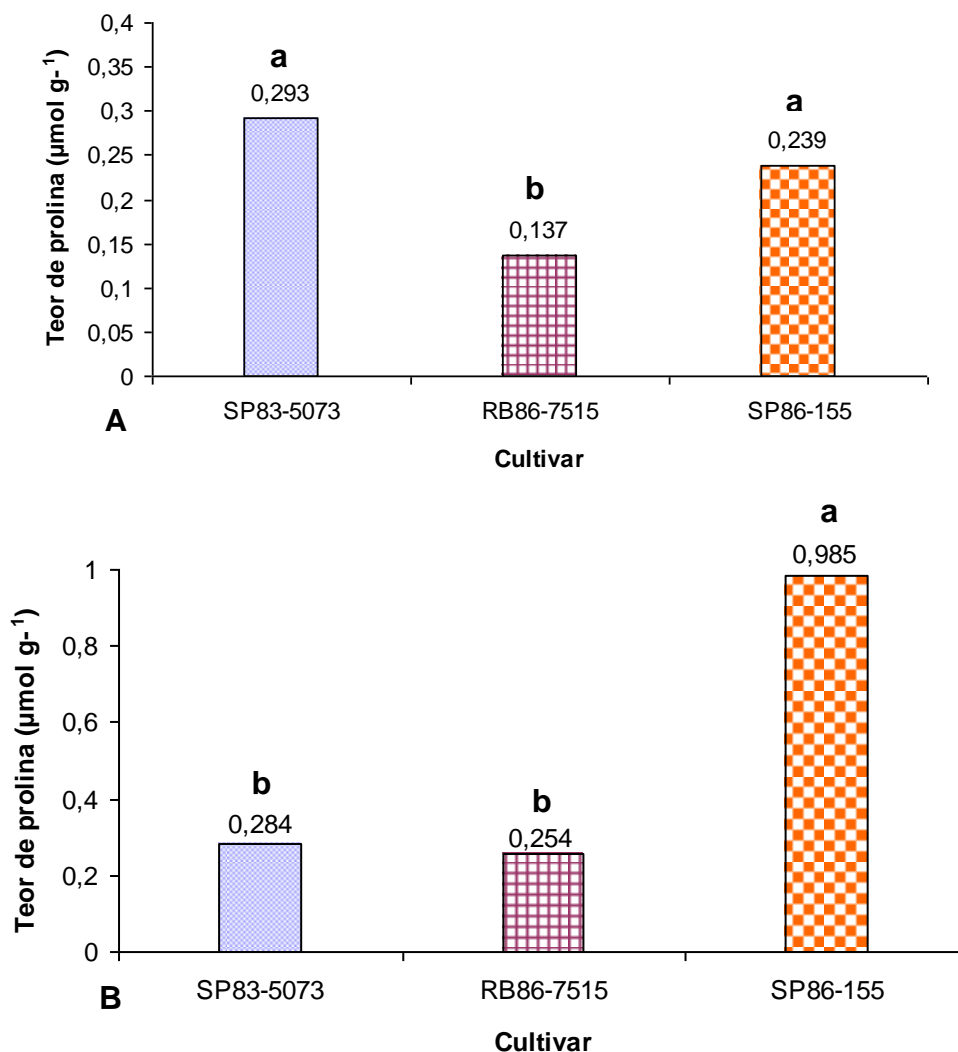


Figura 7 - Teor de prolina livre em função da época de coleta com 3 dias de supressão da rega (A) e 5 dias de supressão da rega (B). Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade *Free proline content as a function of collection time with 3 days of suppression of irrigation (A) and 5 days of suppression of irrigation (B). Means followed by different letters differ by Tukey test at 5% of probability.*

Identificação dos fragmentos expressos

Das 12 combinações de *primers* seletivos *EcoRI/MseI*, apenas duas combinações não geraram padrão de fragmentos expressos, provavelmente por não permitirem uma amplificação adequada. Em média, as combinações de iniciadores utilizados nas cultivares tolerantes ao estresse hídrico geraram padrões de fragmentos que variaram de 80 a 890 pb. Na Figura 9, podemos observar um exemplo de padrão de fragmentos detectados pela técnica de cDNA-AFLP.

Nas 10 combinações restantes, foram observados, por meio da análise visual, 1.077 padrões de fragmentos de cDNA-AFLP, em que foram considerados fragmentos expressos (FEs), aqueles identificados pela ausência do fragmento na cultivar sensível ao estresse hídrico quando submetida à supressão da rega e fragmentos

exclusivos expressos nas cultivares tolerantes (FEs-T), desde que ausentes em suas plantas-controle. Foram observados 463 FEs na cv SP83-5073, sendo 170 FEs nas plantas sob estresse hídrico e 18 FEs-T. Para a cultivar RB86-7515, foram observados 614 FEs, sendo 283 FEs nas plantas sob supressão da rega e 30 FEs-T. As plantas-controle (que não foram submetidas à supressão da rega) apresentaram o maior número de FEs (293 e 331) para as cultivares SP83-5073 e RB86-7515, respectivamente. Foram recuperados do gel de poliacrilamida um total de 453 fragmentos expressos nas plantas sob déficit hídrico, nas duas cultivares, ao passo que 48 desses fragmentos foram expressos exclusivamente nas cultivares tolerantes (FEs-T). Logo após, os fragmentos foram eluídos em tampão TE.

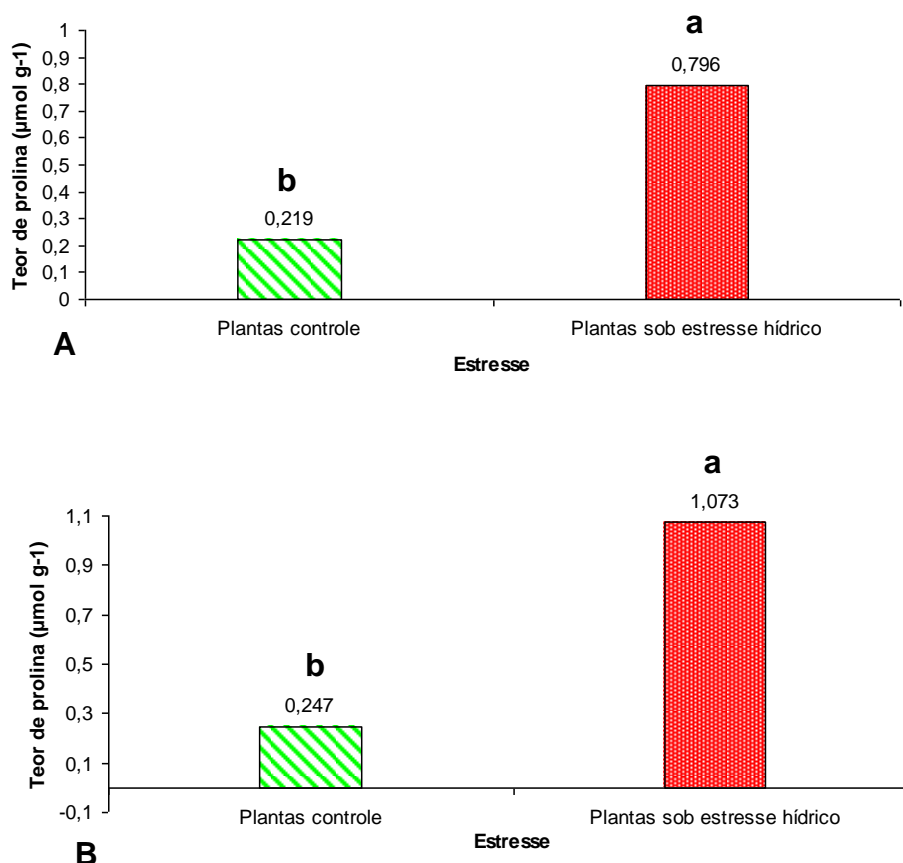


Figura 8 - Teor de prolina livre em função do estresse hídrico com 5 dias de supressão da rega (A) e 10 dias de supressão da rega (B). Médias seguidas por diferentes letras minúsculas, em cada figura, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. *Free proline content as influenced by a drought period (A) five days and (B) ten days of water suppression. Means followed by different lower case letters are statistically different at the 5% level of probability, according to Tukey's test.*

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

Foram realizadas as reamplificações de 18 FEs-T oriundos das combinações ACT-CTG e ACT-CTT, sendo 11 FEs-T pertencentes à cv RB86-7515 e 7 FEs-T à cv SP83-5073. Após a reamplificação desses fragmentos, foram realizadas novas reamplificações com os FEs-T restan-

tes, sendo que, após a realização das leituras de absorbância, verificação em gel de agarose a 1% e purificação dos produtos de amplificação, não foi possível clonar nenhum outro fragmento. De acordo com KOO & JAYKUS (2000), os contaminantes de PCR de géis de poliácridamida coelui com o DNA, prejudicando a reamplificação desses fragmentos.

Dos 18 FEs-T, nas duas cultivares tolerantes ao estresse hídrico, seis foram clonados e sequenciados com sucesso, mas ao analisar as sequências dos contigs, verificou-se que dois fragmentos possuem as mesmas sequências e, conseqüentemente, apresentam similaridade com as mesmas proteínas. Por essa razão, o trabalho foi conduzido apenas com quatro contigs, que foram renomeados como SCWSC1_79 (*Sugarcane Water Stress Cultivar* SP83-5073), SCWSC2_31, SCWSC2_44 e SCWSC2_99 (*Sugarcane Water Stress Cultivar* RB86-7515).

As sequências dos contigs foram submetidas à busca nos bancos de dados do NCBI, utilizando a ferramentas BlastX e BlastN (contra o banco de dados NR).

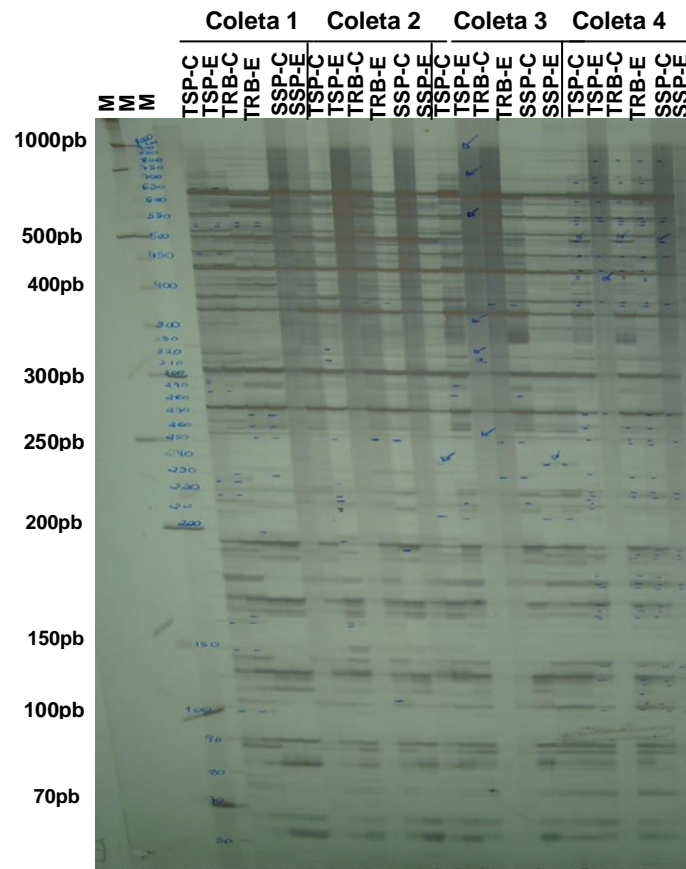


Figura 9 - Padrão de fragmentos detectados pela técnica de cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata. Foram utilizados palmitos das plantas-controle e sob supressão da rega de três cultivares de cana-de-açúcar. TSP-C (SP83-5073 Controle), TSP-E (SP83-5073 sob estresse hídrico), TRB-C (RB86-7515 controle), TRB-E (RB86-7515 sob estresse hídrico), SSP-C (SP86-155 controle) e SSP-E (SP86-155 sob estresse hídrico). Marcador de tamanho molecular de 50pb, de 20pb e de 10pb, respectivamente. *Pattern of fragments detected by the cDNA-AFLP technique in a 6% polyacrylamide gel stained with silver nitrate. Plant marrows of the TSP-C (SP83-5073 check treatment), TSP-E (SP83-5073 submitted to water stress), TRB-C (RB86-7515 check treatment), TRB-E (RB86-7515 submitted to water stress), SSP-C (SP86-155 check treatment), and SSP-E (SP86 – 155 submitted to water stress) were used. Molecular size markers of 50pb, 20pb, and 10pb, respectively, were used.*

A cobertura dos fragmentos obtidos neste trabalho foi determinada por meio de maiores identidades (Tabela 3). Na cultivar RB86-7515, foi verificado que o SCWSC2_31, de 237 pb, mostrou homologia com a proteína Citocromo P450 de sorgo, com *E value* de 2×10^{-20} , utilizando a ferramenta BlastN (Tabela 3).

As enzimas citocromo P450 são importantes reguladores do crescimento de plantas por catalisarem a síntese e degradação de hormônios de crescimento, tais como giberelinas, auxinas e brassinoesteroides, além de outros hormônios, como o jasmonato e o ácido abscísico (ABA). As reações catalisadas por estas enzimas são extremamente diversas, porém geralmente envolvem a transferência de seus átomos de oxigênio para um substrato e redução de outro átomo para formar água na presença de NADPH e NADP (REICHHARTA et al., 2002; COON,

2005). Esta enzima participa da via de biossíntese de metabólitos secundários, como fenilpropanoides, flavanoides, alcaloides, lipídeos e lignina, além de atuar na detoxificação de xenobióticos, como, por exemplo, herbicidas (KIM & TSUKAYA, 2002). Um membro da família de citocromos P450 foi identificado como ABA 8'-hidroxilase, uma enzima que degrada ABA durante o embebecimento da semente e estresse por dessecação (KUSHIRO et al., 2004; SAITO et al., 2004). A atividade desta enzima é alta em plantas se recuperando de estresse abiótico, como, por exemplo, estresse hídrico. Desta maneira, a concentração e as respostas biológicas do hormônio ABA podem ser afetadas pelas rotas de síntese e degradação em função de alterações ambientais (KIM & TSUKAYA, 2002).

Tabela 3 - Análise da similaridade dos *contigs* dos quatro FEs-T sequenciados, utilizando BlastX e BlastN. *Contig similarity analysis of the four sequenced Fes-T using BlastX and BlastN.*

¹ FEs-T	² EC	³ Pb	⁴ ID	⁵ E value	Descrição	Nova descrição
SCWSC2_31	2 ^a	237	83/95 (87%)	2x10 ⁻²⁰	gb AF029856.1 Sorghum bicolor cytochrome P450 CYP98A1	-
SCWSC2_44	2 ^a	116	22/24 (92%)	5x10 ⁻¹⁰	gb EES12507.1 hypothetical protein SORBIDRAFT_06g022510 [Sorghum bicolor]	beta-glucosidase
SCWSC1_79	1 ^a	97	72/75 (96%)	7x10 ⁻²⁵	gb CA269256.1 SCBGRT3072G08.g RT3 Saccharum hybrid cultivar SP80-3280 cDNA	Zea mays GAPC2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA
SCWSC2_99	2 ^a	297	83/89 (93%)	2x10 ⁻⁵⁹	gb EES00871.1 hypothetical protein SORBIDRAFT_03g023980 [Sorghum bicolor]	Atividade de DNA helicase

¹FEs-T - Fragmentos expressos apenas nas cultivares tolerantes submetidos à supressão da rega e ausentes em suas plantas-controle; ²EC – Épocas de coletas; ³Pb – Tamanho dos fragmentos (pares de bases); ⁴ID – Identidade; ⁵E value: valor estatístico de probabilidade de erro da similaridade encontrada nos resultados apresentados pela utilização da ferramenta NCBI-BLAST (ALTSCHUL et al., 1990).

FERRO (2008), utilizando a técnica de ma-
croarranjo de cDNA, a fim de monitorar a expres-
são de genes em palmito de cana-de-açúcar
submetida a 17 dias de estresse hídrico, identifi-
cou dois transcritos diferencialmente expressos
com similaridade a membros da família de cito-
cromos P450, sendo que um clone, SCJFRZ2030D03.g, apresentou perfil de indução
ao longo do período de 17 dias de estresse,
enquanto o outro clone, SCCCRZ3003B05.g,
apresentou perfil de inibição e repressão. Neste
estudo, dois clones, SCWSC2_4 e SCWSC2_5,
oriundos da cultivar intermediária, foram expres-
sos no 3^o dia de estresse e apresentaram simila-
ridade com a enzima citocromo P450. SOUZA
(2011), estudando folhas de cana-de-açúcar da
cultivar SP80-3280, submetidas a 30; 45; 60 e 75
dias de tratamento com CO₂, observou menor
expressão do gene da enzima citocromo P450
aos 45 dias, sugerindo que as plantas em eleva-
da concentração de CO₂ diminuem o investimen-
to no metabolismo secundário, o que se deve ao
fato de ter intensificado o crescimento das plan-
tas sob elevado CO₂.

Foi expresso, na cultivar RB86-7515, o
fragmento SCWSC2_44 de 116 pb que mostrou
homologia com proteína hipotética de sorgo,
sendo denominada de
SORBIDRAFT_06g022510, com E value de
5x10⁻¹⁰ (Tabela 3). Esta proteína hipotética, de
acordo com as anotações no Gene Ontology
(GO), está envolvida no processo biológico de
metabolismo de carboidrato com a função
molecular de β-glucosidase.

A β-glucosidase (3.2.1.21) é um glicosil
hidrolase que hidrolisa a ligação β-O-glicosídica
no carbono anomérico de uma molécula de glico-
se no final de uma molécula de carboidrato ou
glicosídeo. Essas enzimas são encontradas
essencialmente em todos os organismos vivos e
têm sido implicadas em uma diversidade de
papéis, tais como a conversão de biomassa por
microrganismos (FOWLER, 1993), ativação de
compostos de defesa (POULTON, 1990;
DUROUX et al., 1998), precursores da lignina
(DHARMAWAR-DHANA et al., 1995), e interme-
diários metabólicos, liberando grupos de glicose
a partir do bloqueio de glicosídeos inativos em
plantas (BARLEBEN et al., 2005). A enzima β-
glicosidase pertence à grande família glicosilhi-
drolase 1 e 3 (HENRISSAT, 1991), sendo essas
famílias mais numerosas em plantas. A família 1
contém ampla gama de β-glicosidases, incluindo
β-galactosidases, β-mannosidases, fosfo-β-ga-
lactosidases, fosfo-β-glicosidases, e thiogluco-
sidases, além de β-glicosidases. Essas enzimas,
apesar de sua alta similaridade de sequências,
apresentam atividades diversas no metabolismo
(MIZUTANI et al., 2002; HENRISSAT, 1991;
RAYCHAUDHURI & TIPTON, 2002).

Na cultivar SP86-5073, foi verificado o
fragmento SCWSC1_79, que apresentou similar-
dade com uma sequência de cDNA do genoma
da cana-de-açúcar SCBGRT3072G08.g RT3
Saccharum hybrid, cultivar SP80-3280, com E
value de 7x10⁻²⁵ (Tabela 3). Foi realizada uma
pesquisa no Gene Bank, utilizando o número de
acesso e verificou-se que essa sequência possui

similaridade com a proteína glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, com *E value* de 8×10^{-50} .

A função da GPD, como um tetrâmero de subunidades idênticas, é converter o NAD + produto de fosforilação oxidativa dependente de gliceraldeído 3 fosfato para 1-3 bifosfoglicerato. Esta é uma das reações metabólicas mais importantes da via glicolítica (NIU et al., 1994; REDKAR et al., 1998; HIRANO et al., 1999). A enzima também catalisa a reação inversa. JEONG et al. (2000) submetem plantas de batatas, transgênicas e selvagens, ao estresse salino. As plantas que superexpressam o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, isolado de um tipo de cogumelo comestível (GPD P. sajor-caju), foram altamente tolerantes ao estresse salino, enquanto as plantas do tipo selvagem morreram após 10 dias de estresse. Esses autores sugerem que essa enzima pode funcionar como um mediador de resposta metabólica induzida por estresse e outras mudanças metabólicas integradas durante estresse biótico. A partir desses resultados, JEONG et al. (2001), em trabalho posterior, conseguiram obter plantas transgênicas de batata altamente resistente ao estresse salino, superexpressando o gene GPD P. sajor-caju. Por essa razão, esses autores confirmam que a superexpressão do gene GPD pode gerar plantas transgênicas de batata, resistentes ao estresse salino.

O fragmento SCWSC2_99 de 297 pb, expresso na cultivar RB86-7515, mostrou similaridade com a proteína hipotética de sorgo, sendo denominada de SORBIDRAFT_03g023980, com *E value* de 2×10^{-59} (Tabela 3). De acordo com as anotações na *Gene Ontology* (GO), esta proteína está envolvida na função molecular de atividade de DNA helicase. Helicases são proteínas motoras que catalisam o desenrolamento do DNA duplex/RNA de uma maneira dependente de ATP e, assim, desempenham papel importante na maioria dos processos genéticos básicos, incluindo replicação, reparo, recombinação, transcrição e tradução (TUTEJA & TUTEJA, 2004). SONG (2005) verificou, em plantas de soja, que a DNA helicase mitocondrial foi ativa entre 100-200 mM de NaCl, e acima dessa concentração, a atividade dessa enzima foi inibida. Além disso, a temperatura elevada, acima de 50 °C, também inibiu a atividade da enzima, sendo que as temperaturas ótimas foram de 30 °C, 37 °C e 42 °C. LIU et al. (2008) isolaram um gene de resistência ao estresse salino de *Apocynum venetume*, denominado de AvDH1, cujo produto gênico prediz uma proteína da família de DNA helicase.

Durante seu ciclo de vida, muitos organismos são confrontados com numerosos estresses ambientais que podem afetar sua sobrevivência, e, conseqüentemente, muitos genes que

respondem ao estresse por seca, salinidade, alta e baixa temperatura têm sido estudados (ISHITANI et al., 1998), mostrando que esses genes estão envolvidos na função de proteger a célula contra os estresses (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997).

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

Conclusões

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

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

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

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

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

A análise comparativa dos fragmentos derivados de transcrito diferencialmente expressos entre os genótipos tolerantes e sensíveis foi expressa em maior número nas plantas-controle;

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

Os FEs-T, nas cultivares tolerantes, fornecem sequências candidatas que poderão ser posteriormente testadas para a verificação de sua relação com o caráter de tolerância apresen-

tado pelas cultivares de cana-de-açúcar em que foram detectados.

Referências

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

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

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

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

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

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

COON, M. J. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v.45, p.1-25, 2005.

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

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**, Athens, v.19, p.299-306, 2001.

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

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

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

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

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

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

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, 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.

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, Jaboticabal.

- FOWLER, T. Deletion of the *Trichoderma reesei* β -glucosidase gene, *bgl1*. In: ESEN, A. (Ed.). **β -glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology**. Washington, DC: American Chemical Society, 1993. p.56-65.
- GONÇALVES, E. R. **Fotossíntese, osmorregulação e crescimento inicial de quatro variedades de cana-de-açúcar submetida à deficiência hídrica**. 2008. 66f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.
- GREEN, P. **PHRAD documentation**. 1996. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>>. Acesso em: 28 mar. 2011.
- GUIMARÃES, E. R. **Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar: resistência genotípica e interação planta-praga**. 2007. 53f. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, London, v.280, p.309-316, 1991.
- HIRANO, T.; SATO, T.; OKAWA, K.; KANDA, K. Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Lentinus edodes*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.63, n.7, p.1223-1227, 1999.
- INMAN-BAMBER, N. G. Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. **Field Crops Research**, Ontario, v.89, n.1, p.107-122, 2004.
- ISHITANI, M.; XIONG, L.; LEE, H.; STEVENSON, B.; ZHU, J.K. HOSI, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v.10, p.1151-1161, 1998.
- JEONG, M. J.; PARK, S. C.; BYUN, M. O. Improvement of Salt Tolerance in Transgenic Potato Plants by Glyceraldehyde-3 Phosphate Dehydrogenase Gene Transfer. **Molecular Cell**, Cambridge, v.12, n.2, p.185-189, 2001.
- JEONG, M. J.; PARK, S. C.; KWON, H. B.; BYUN, M. O. Isolation and characterization of the gene encoding glyderaldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Westbury, v.278, p.192-196, 2000.
- KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, Bangalore, v.88, n.3, p.424-438, 2005.
- KIM, G. T.; TSUKAYA, H. Regulation of the biosynthesis of plant hormones by cytochrome P450s. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.115, p.169–177, 2002.
- KOO, K.; JAYKUS, L. Methods for avoiding PCR-inhibiting contaminants when eluting DNA from polyacrylamide gels. **Biotechniques**, Natick, v.29, p.694-696, 2000.
- KUSHIRO, T.; OKAMOTO, M.; NAKABAYASHI, K.; YAMAGISHI, K.; KITAMURA, S.; ASAMI, T.; HIRAI, N.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, KAMIYA, Y.; NAMBARA, E. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. **The Embo Journal**, Oxford, v.23, n.7, p.1647–1656, 2004.
- LIANG, P.; PARDEE, A. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v.257, p.967-971, 1992.
- LIU, H. H.; LIU, J.; FAN, S. L.; SONG, M. Z.; HAN, X. L.; LIU, F.; SHEN, F. F. Molecular cloning and characterization of a salinity stress-induced gene encoding DEAD-box helicase from the halophyte *Apocynum venetum*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.59, n.3, p.633–644, 2008.
- MACHADO, R. S.; RIBEIRO, R. V.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, D. F. S. P.; MACHADO, E. C.; LANDELL, M. G. A. Respostas biométricas e fisiológicas ao déficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.12, p.1575-1582, 2009.
- MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA JR., G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, n.2, p.295-301, 2001.
- MIZUTANI, M.; NAKANISHI, H.; EMA, J.; MA, S.; NOGUCHI, E.; INOHARA-OCHIAI M.; FUKUCHI-MIZUTANI, M.; NAKAO, M.; SAKATA, K. Cloning of β -primeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.130, p.2164-2176, 2002.
- NIU, X.; WANG, H.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Molecular cloning and expression of a glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene in desert halophyte, *Atriplex rummularia* L. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.104, p.1105-1106, 1994.
- OBER, E. S.; LUTERBACHER, M. C. Genotypic variation for drought tolerance in *Beta vulgaris*. **Annals of Botany**, London, v.89, p.917-924, 2002.

- OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E.; ZAMBON, J. L. C.; WEBER, W.; IDO, O. T.; BESPALHOK-FILHO, J.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; DA SILVA, D. K. T. Área foliar em três cultivares de cana-de-açúcar e sua correlação com a produção de biomassa. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.37, n.2, p.71-76, 2007.
- 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**, Orlando, v.44, p.1231-1241, 2007.
- POULTON, J. E. Cyanogenesis in plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.94, p.401-405, 1990.
- RAYCHAUDHURI, A.; TIPTON, P. A. Cloning and expression of the gene for soybean hydroxyisourate hydrolase. Localization and implications for function and mechanism. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.130, p.2061-2068, 2002.
- REDKAR, R. J.; HERZOG, R. W.; SINGH, N. K. Transcriptional activation of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* promoter by osmotic signals. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.2229-2231, 1998.
- REICHHARTA, D. W.; BAK, S.; PAQUETTE, S. **Cytochromes P450**. The *Arabidopsis* Book Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, 2002.
- SAITO, S.; HIRAI, N.; MATSUMOTO, C.; OHIGASHI, H.; OHTA, D.; SAKATA, K.; MIZUTANI, M. *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. **Plant Physiology**, Lancaster, v.134, n.4, p.1-11, 2004.
- 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**, Washington, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.
- SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. Anatomia e botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p.47-56.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.58, n.2, p.221-227, 2007.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.6, n.5, p.410-417, 2003.
- SILVA, P. B. **Aspectos fisiológicos de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos a estresse hídrico**. 2010. 89f. Dissertação (Mestrado em Agronomia na Área de Produção Vegetal e Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2010.
- SILVA, M. A.; SOARES, R. A. B.; LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P. Agronomic performance of sugarcane families in response to water stress. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.3, p.655-661, 2008.
- SMIT, M. A.; SINGELS, S. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, Ontario, v.98, n.2-3, p.91-97, 2006.
- SONG, D. **Homologous strand exchange and DNA helicase Activities in plant mitochondria**. 2005. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Brigham Young University, Provo, UT, 2005.
- STEIN, J.; LIANG, P. Differential display technology: a general guide. **Cellular Molecular Life Science**, Basel, v.8, p.1235-1240, 2002.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2004. 719p.
- TUTEJA, T.; TUTEJA, R. Unraveling DNA helicases: motif, structure, mechanism and function. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.271, p. 1849–1863, 2004.
- TZVELEV, N. N. The system of grasses (Poaceae) and their evolution. **The Botanical Review**. Lancaster, v.55, n.3, p.141-204, 1989.
- VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, v.270, p.484-487, 1995.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; PELEMAN, J.; KULPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.
- YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. **Photosynthetica**, Prague, v.38, n.1, p.171-186, 2000.