UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

DEBORAH SANAE NISHIMURA

Caracterização molecular da glutationa S-transferase de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em resposta a aplicação de herbicidas

> Piracicaba 2007

DEBORAH SANAE NISHIMURA

Caracterização molecular da glutationa S-transferase de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em resposta a aplicação de herbicidas

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

> Piracicaba 2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Nishimura, Deborah Sanae

Caracterização molecular da glutationa S-transferase de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em respostas a aplicação de herbicidas / Deborah Sanae Nishimura; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2007.

113 p. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

Biologia molecular vegetal 2. Filogenia 3. Expressão gênica
Melhoramento genético vegetal 5. Transcrição gênica I. Título

CDU 633.61:577.21

Aos meus pais Maria Rosa e Carlos, e aos meus irmãos André, Fábio e César pelo amor, apoio e companheirismo sempre.

OFEREÇO

Ao meu sobrinho-afilhado Lucas pelo carinho e amizade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por proporcionar-me a vida e a saúde; permitindo a busca dos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira pela orientação, paciência e amizade contribuindo para meu desenvolvimento acadêmico e científico. Muito obrigado por acreditar.

À Dra. Sabrina M. Chabregas pesquisadora do Centro de Tecnologia Canavieira, pelo fornecimento do material vegetal e apoio permanente; bem como aos doutores Eugênio C. Ulian e Maria Cristina Falco.

Ao Prof. Dr. Pedro Jacob Christoffoleti, Laboratório de Plantas Daninhas do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, por disponibilizar seus alunos para o experimento com os herbicidas.

À Fabiana Cannavan e a Prof^a. Dr. Sui Mui Tsai, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, pelo auxílio mútuo no sequenciamento.

Agradeço a funcionária Nirlei Silva e ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, pela disponibilização do equipamento analisador de imagens.

A aluna de doutorado Ane de Medeiros do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, pela ajuda nas análises de expressão gênica. Aos integrantes do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Aline Possignolo, Beatriz Maia, Celso Gaspar Jr, Danielle Scotton, Fabrício Oliveira, Felipe Fonseca, Felippe Campana, Janaina Albino, João Felipe Oliveira, João Fernando Bortoleto, Jurema Queiroz, Ligia Santos, Lucélia Borgo, Maria Lorena Sereno, Onildo Nunes, Renato Ferreira, Tais Tomazin, Thaísa Pinheiro e Vagner Benedito pelo companheirismo, apoio, convívio em equipe e troca de experiências.

Em especial, agradeço aos amigos: Gildemberg Leal Junior, Jeanne Machado, Raul Santin Almeida e Tercílio Calsa Junior; pelas sugestões, críticas e opiniões que foram muito importantes no desenvolvimento deste trabalho. A aluna Rebeca B. Siqueira, pela participação no desenvolvimento dos *Southerns*, obrigada pela dedicação, convívio e amizade, que fez momentos difíceis tornar-se mais amenos e alegres.

Aos funcionários do laboratório de Melhoramento de Plantas: José Alves, Luís Eduardo Fonseca, Paulo Cassieri, Raquel Orsi e Wlamir Godoy, pela amizade e auxílio imprescindível nas várias fases do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores que contribuíram na minha formação acadêmica. Aos meus exorientadores da iniciação científica: Dr. Rodrigo Latado e o Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto, obrigada pelo incentivo e encaminhamento para a pós-graduação.

Aos meus amigos do coração: Henrique Souza, Joni Lima, Lisa Lourenço, Marcel Ambo, Raquel Campos, Rodrigo Latado e a turma da faculdade (UNIMEP), pela amizade sincera e carinho.

Aos professores do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, que compõem a área de concentração Biologia na Agricultura e no Ambiente.

Ás secretárias da Pós-Graduação do CENA/USP: Cláudia Corrêa, Neuda Oliveira e Regina Freitas (*in memorian*); e as bibliotecárias: Cleide Ferraz, Marília Henyei, Raquel Carvalho e Renata Mazzero.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo e a FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro necessário para a realização desta pesquisa.

Aos meus pais Maria Rosa e Carlos pela convivência, apoio e amizade e meus irmãos André, Fábio e César; pela confiança, dedicação e incentivo mesmo que longe. As minhas cunhadas Carla, Juliana e Neide, pela força. A vocês todos à minha consideração e gratidão.

Ao meu querido sobrinho-afilhado Lucas, pela alegria, aprendizado e participação me fazendo sorrir sempre até mesmo nos momentos difíceis. O amo demais.

Agradeço também o carinho e a presença da minha fiel amiguinha "Mel" (cachorrinha).

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	1
LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS	1
LISTA DE SÍMBOLOS	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	1
2.1 A superfamília das glutationas transferases	1
2.2 Glutationa S-transferase de plantas	2
2.3 GST e metabolismo de desintoxicação de xenobióticos em plantas	
2.4 Tolerância a herbicidas em plantas	2
3 OBJETIVOS	
4 MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Material vegetal e ensaios	
4.2 Identificação de genes associados à GST	
4.3 Classificação dos genes de GST por análise filogenética	
4.4 Construção de iniciadores para os genes de GST	
4.5 Clones de EST	
4.6 Extração de DNA genômico	
4.6.1 Quantificação de DNA genômico	
4.7 Extração de RNA total	
4.7.1 Quantificação de RNA total	2
4.7.2 Tratamento com DNAse	
4.7.3 Síntese de cDNA	2
4.7.4 Análise da identidade dos iniciadores por RT-PCR	
4.7.5 Clonagem e transformação gênica	2
4.8 Seqüenciamento e análise dos resultados	
4.9 Amplificação dos clones de EST com os iniciadores dos genes	
4.10 Amplificação dos cDNAs e genômico com os iniciadores dos genes	
4.11 Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo	
4.11.1 Delineamento experimental e estabilidade gênica	

4.12 Análise por <i>Southern</i> blot	48
4.12.1 Purificação dos clones de EST	48
4.12.2 Digestão do DNA genômico	49
4.12.3 Marcação radioativa (³² P) e purificação da sonda	50
4.12.4 Pré-hibridização e hibridização	51
4.12.5 Lavagens das membranas	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Identificação e classificação de genes associados à GST	52
5.2 Desenvolvimento de iniciadores gene-específico para GST	67
5.3 Análise da expressão dos genes de GST em tecidos/órgãos de cana-de-açúcar	73
5.4 Análise da expressão diferencial de GST nas cultivares de cana-de-açúcar	82
5.5 Análise por <i>Southern</i> blot	92
6 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	96
APÊNDICE	109

RESUMO

Caracterização molecular da glutationa S-transferase de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em resposta a aplicação de herbicidas

A glutationa S-transferase (GST) tem a capacidade de conferir resistência do tipo não-alvo aos efeitos danosos de certos herbicidas em várias culturas, principalmente gramíneas. Entretanto, o papel das GSTs em relação aos herbicidas em cana-de-açúcar é desconhecido, e tal elucidação poderia auxiliar na redução de perdas de produtividade e/ou aumento na eficiência de produção. O objetivo desse trabalho foi caracterizar as diversas classes de GST de cana-de-açúcar por análise filogenética e padrão de expressão por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR). Foi realizada no banco de dados de Saccharum Gene Index a busca completa das sequências codificadoras de GST referentes às classes Phi, Tau, Theta e Zeta, baseando-se nos 61 genes de GST de arroz; estas foram traduzidas e empregadas em análise filogenética. Foram identificados 18 agrupamentos de ESTs codificando GSTs, totalizando 355 transcritos das 255.635 sequências disponíveis no banco de dados. A análise filogenética identificou 7 agrupamentos como pertencentes à classe Phi (denominados ScGSTF), 7 como Tau (ScGSTU), 1 como Theta (ScGSTT), e 3 como Zeta (ScGSTZ); respectivamente. As classes Phi e Tau, consideradas planta-específica, foram as mais representativas em termos de número de agrupamentos de ESTs em relação à Theta e Zeta (mamífero-específica). Os 18 agrupamentos de cana-de-açúcar equivalem aos genes mais expressos em termos de número de ESTs individuais em arroz. Foram extraídos RNA de diversos tecidos/órgãos, e de tecido foliar das cultivares 'SP87-365' e 'SP80-3280' coletados a 0 e 48 h após tratamento com herbicidas, seguida da síntese de cDNA e RT-qPCR. O gene da proteína ribossômica rpl35-4 foi determinado como referência nas análises de expressão. A expressão nos tecidos/órgãos mostraram que os genes ScGSTF3, ScGSTU8 e ScGSTU13 foram menos expressos no colmo, inflorescência, meristema e raiz em relação ao limbo foliar; ScGSTF4, ScGSTF6, ScGSTF14 e ScGSTF15 foram mais expressos no colmo; ScGSTF5, ScGSTU1, ScGSTU17, ScGSTU31, ScGSTU39 e ScGSTT1 na inflorescência; e ScGSTZ1 foi único mais expresso no meristema. De forma geral, todas as classes tiveram expressão detectada nos tecidos, mas os genes da Phi e Tau foram os mais expressos. Os genes da classe Phi foram mais expressos no colmo em relação aos demais; os da classe Tau e Theta na inflorescência; e os da Zeta no meristema. A validação a 0 h determinou que os genes ScGSTF3, ScGSTF4, ScGSTU8, ScGSTU13 e ScGSTU17 foram os mais expressos na cultivar 'SP80-3280' em relação à 'SP87-365'. As evidentes diferenças na expressão basal entre as cultivares foram dos genes das classes Phi e Tau. Com relação à expressão das GSTs 48 h após aplicação dos herbicidas, foi observado que a aplicação de Ametryn ou Diuron, os genes de GST foram induzidos, enquanto foram reprimidos com Imazapic ou Isoxaflutole. Os genes ScGSTF3, ScGSTF4, ScGSTU13 e ScGSTU17 foram os mais expressos nas cultivares tratadas com os herbicidas; e foram considerados possíveis candidatos a associação em resposta a desintoxicação desses herbicidas. O Southern blot determinou que o maior número de cópias de GST em cana-de-acúcar foi os pertencentes às classes Phi e Tau, sendo nas classes Zeta e Theta, menos freqüentes.

Palavras-chave: cana-de-açúcar, GST, filogenia, tecidos/órgãos RT-qPCR, herbicidas, Southern.

ABSTRACT

Molecular characterization of sugarcane (*Saccharum* spp.) glutathione S-transferase in response to herbicide application

Glutathione S-transferase (GST) has the ability to confer non-target tolerance to damaging effects of certain herbicides in various crops, especially grasses. However, the role of GSTs in relation to herbicide tolerance in sugarcane s is unknown, and its elucidation could help in reducing yield losses and/or increase in production efficiency. The objective of this work was to characterize the various classes of sugarcane GSTs by phylogenetic analyses and expression profile using RTgPCR. A complete search at the Saccharum Gene Index database was conducted for sequences encoding GSTs from the classes Phi, Tau, Theta and Zeta, based on 61 rice GST genes; the conceptually translated sequences were used in the phylogenetic analyses. Eighteen EST clusters encoding GSTs were identified, in a total of 355 transcripts out of the 255,635 available sequences at the database. Phylogenetic analysis identified 7 groups as belonging to Phi class (denominated ScGSTF), 7 as Tau (ScGSTU), one as Theta (ScGSTT), and 3 as Zeta (ScGSTZ); respectively. The Phi and Tau classes, considered plant-specific, were the most frequent in terms of number of EST clusters in comparison to Theta and Zeta (mammal-specific). The 18 groups of sugarcane ESTs were equivalent to the mostly expressed ortologues in rice. Total RNA from various tissues and organs, and from leaves from cultivars 'SP87-365' and 'SP80-3280', collected at 0 and e 48 h after treatment with herbicides were obtained and converted into cDNA, and analyzed by RT-qPCR. The transcript of the ribosomal protein rpl35-4 was established as gene reference for the RT-qPCR analyses. The analyses of expression in tissues/organs demonstrated that the genes ScGSTF3, ScGSTU8 and ScGSTU13 were less expressed in stem, inflorescence, meristem and roots in relation to leaf blades; ScGSTF4, ScGSTF6, ScGSTF14 and ScGSTF15 were more expressed in stems; ScGSTF5, ScGSTU1, ScGSTU17, ScGSTU31, ScGSTU39 and ScGSTT1 in the inflorescence; and ScGSTZ1 was the only more expressed in the meristem. In general, all classes had gene member expression detected in the tissues, but the genes from Phi and Tau were the most expressed. The genes from class Phi were more expressed in the stem in comparison to the others; genes from classes Tau and Theta were more expressed in the inflorescence; and the ones from Zeta in meristem. Gene expression validation at 0 or 48 h after treatment with herbicides determined that ScGSTF3, ScGSTF4, ScGSTU8, ScGSTU13 and ScGSTU17 were more expressed in cultivar 'SP80-3280' than 'SP87-365'. The more evident differences in basal expression between cultivars were for genes from classes Phi and Tau. In response to herbicides treatment, GSTs expression was higher in response to Ametryn or Diuron in comparison to Imazapic or Isoxaflutole. Genes ScGSTF3, ScGSTF4, ScGSTU13 and ScGSTU17 displayed more difference in expression at 48 h between cultivars, and might be associated with differences in herbicide detoxification. Southern blot analyses determined that a larger number of GST gene copies in sugarcane from classes Phi and Tau, with less copies from classes Zeta and Theta.

Keywords: sugarcane, GST, phylogeny, tissues/organs, RT-qPCR, herbicide, Southern.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	alinhamento local de seqüências (Basic Alignament Sequence Tool)			
ORF	quadro aberto de leitura (Open Reading Frame)			
cluster	agrupamento de ESTs alinhados			
EST	etiqueta de seqüência expressa (Expressed Sequence Tag)			
SB	tampão ácido bórico – sódio (Sodium Boric Acid)			
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético			
cDNA	DNA complementar ao mRNA			
PCR	reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)			
RT-PCR	transcrição reversa seguida de PCR			
RT-qPCR	transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo-real			
DNA	ácido desoxirribonucléico			
RNA	ácido ribonucléico			
CTAB	brometo de hexadiltrimetilamônio			
UV	Ultravioleta			
dNTP	N-desoxinucleótideo trifosfato			
SDS	dodecil sulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulfate)			
TAE	tris-ácido acético-EDTA			
BSA	albumina de soro bovino (Bovine Serum Albumin)			
rpm	rotação por minuto			
$[\alpha - {}^{32}P]$ -dCTP	citosina marcada com ³² P			
SSC	solução salina de citrato de sódio			
cpm	contagem por minuto			

LISTA DE SÍMBOLOS

ton	Tonelada
pb	pares de bases
°C	graus Celsius
μg	micrograma
μL	microlitro
L	litro
ha	hectar
g	grama
mg	miligrama
min	minuto
atm	atmosfera
mL	mililitro
seg	segundo
g	constante gravitacional
h	hora
nm	nanômetro
mМ	milimolar
μΜ	micromolar
kV	tensão elétrica
ng	nanograma
U	unidade de enzima (Weiss)
М	molar
cm	centímetro
μJ	microjoule
%	por cento
V	volts

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, estimando-se a produção nacional em 427 milhões de ton na safra 2006/2007 (Agrianual, 2007), sendo São Paulo responsável por 60% de toda a produção nacional, cerca de 255 milhões de ton. Aproximadamente 55% da produção canavieira brasileira são destinadas à fabricação de álcool, estimando-se uma produção de 17,39 bilhões de litros para 2007, e o restante para produção de açúcar, chegando a 28,35 milhões de ton. Esta cultura chega a movimentar cerca de R\$ 36 bilhões/ano, o que representa quase 3,5% do PIB nacional (Agrianual, 2007). A cana-de-açúcar é cultivada numa área de 5,82 milhões de ha, sendo a produção processada por 320 usinas (Agrianual, 2007) e 67 destilarias (UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo; http://www.portalunica.com.br, acesso em 14/06/07). Além de outras aptidões da cultura, que vão desde a capacidade de gerar energia elétrica (FIGUEIRA, 2005) até o potencial para fitorremediação (SERENO et al, 2006).

Devido à importância crescente desta cultura e a imensa área utilizada para seu plantio em escala industrial, a utilização de herbicidas é praticamente obrigatória, requerendo produtos cada vez mais eficazes e seletivos, mas com custos elevados, que podem alcançar valores de 240 milhões de dólares/ano. Diante deste cenário, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento e utilização de novas tecnologias que diminuam os custos associados à aplicação de herbicidas, como também as perdas resultantes na produção de cana-de-açúcar inerente a aplicação. Uma possível solução seria a utilização de cultivares de cana-de-açúcar tolerante a herbicidas. Outra possibilidade seria a utilização de componentes endógenos das plantas que pudessem conferir as cultivares maior tolerância a compostos exógenos. A glutationa S-transferase (GST) é uma enzima que tem a capacidade de conferir resistência aos efeitos danosos de certos herbicidas, estando associada à maior tolerância em várias culturas, principalmente gramíneas (EDWARDS et al. 2005a). Em algumas culturas, as GSTs respondem diretamente a atuação dos herbicidas, acionando um processo metabólico de desintoxicação das plantas. A glutationa S-transferase tem a função de catabolizar à reação de transferência do tripeptídeo glutationa reduzida (GSH; γ-glutamil-cisteina-glicina) para substratos eletrofílicos tóxicos (endógenos ou exógenos), tornando-os compostos solúveis menos tóxicos para a célula, e estes por sua vez são transportados para o vacúolo (MARRS, 1996).

Nos últimos anos, projetos de seqüenciamento genômico associados a análises do perfil transcricional buscaram identificar características gênicas de interesse da cana-de-açúcar. Estes estudos têm sido realizados com genes de interesse agronômico ou com potencial biotecnológico nas mais diversas cultivares e/ou tecidos/órgãos da planta, estando correlacionados com importantes processos biológicos de resposta a estresse biótico e abiótico. Em cana-de-açúcar, o comportamento da enzima GST em resposta a aplicação de herbicidas é pouco conhecido, e tal elucidação poderia auxiliar na redução de perdas de produtividade e/ou aumento na eficiência de produção.

Para tanto, este trabalho objetivou identificar e caracterizar os genes referentes às quatros classes da enzima GST de cana-de-açúcar a título de avaliar a expressão dos mesmos por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) nos diversos tecidos/órgãos da planta, e nas cultivares presumivelmente contrastantes ('SP87-365' - sensível à atuação de herbicidas e 'SP80-3280' - tolerante aos herbicidas), segundo observações realizadas no campo experimental do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). Estas observações têm sido confirmadas em ensaios em nosso laboratório, onde a 'SP80-3280' demonstrou maior tolerância

ao herbicida Ametryn, enquanto que 'SP87-365' mostrou grande sensibilidade. Essa diferença em tolerância a Ametryn parece estar associada a uma maior atividade de GST em 'SP80-3280' em relação à 'SP87-365'.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A superfamília das glutationas transferases

Glutationa S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) faz parte de uma superfamília de proteínas catalíticas e ligantes, distribuídas em uma grande diversidade de organismos aeróbicos, de bactérias a humanos (FROVA, 2003). As GSTs são enzimas que catalisam a reação do composto antioxidante não enzimático, o tripeptídeo glutationa (GSH; γ-glutamil-cisteina-glicina) com um eletrófilo hidrofóbico, xenobiótico ou endógeno, os quais podem ser tóxicos e/ou carcinogênicos para o organismo (AMES; PROFET; GOLD, 1990; DIXON; LAPTHORN; EDWARDS, 2002; MEISTER; ANDERSON, 1983; SALINAS; WONG, 1999). Foram primeiramente descobertas em animais em 1961 (BOOTH; BOYLAND; SIMS, 1961; COMBES; STAKELUM, 1961) como responsáveis pelo metabolismo de desintoxicação de drogas (WILCE; PARKER, 1994). Nas plantas, foi detectada em 1970 quando foi descoberta sua importância na conjugação da glutationa (GSH) com a atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-esopropilamino-s-triazina) em milho, protegendo a planta deste herbicida (FREAR; SWANSON, 1970). A desintoxicação da molécula atrazina pela enzima GST é uma resposta primária no processo de desintoxicação de herbicidas pelas plantas (SHIMABUKURO; SWANSON; WALSH, 1970). Nos diferentes organismos, outras funções da enzima GST já foram descritas como a tolerância ao estresse oxidativo (KAMPRANIS et al., 2000); aos inseticidas (RANSON; PRAPANTHADARA; HEMINGWAY, 1997; TANG; TU, 1944) e os antibióticos microbianos (ARCA; HARDISSON; SUAREZ, 1997); transporte de produtos secundários tóxicos (MUELLER et al., 2000); sinalização da célula durante as respostas ao estresse (LOYALL et al., 2000) e fenômenos de resistência envolvendo agentes de quimioterapia contra o câncer (McLELLAN; WOLF, 1999; TEW, 1994).

A glutationa está associada aos mecanismos de prevenção ao estresse oxidativo e funcionando também como sinalizadora do status de oxi-redução celular nos controles de expressão gênica (FOYER; THEODOLOU; DELROT, 2001), além de precursora da biossíntese de fitoquelatinas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). As GSTs mostraram-se importantes na ligação de citotoxinas, bem como porfirinas e drogas em animais, e antocianinas e hormônios em plantas (MARRS, 1996; MUELLER et al., 2000). Além disso, essa família de enzimas contém classes de enzimas como a glutationa peroxidase (GPOX; EC. 1.11.1.9) responsáveis pela remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS), mais especificamente catalisam a reação do H_2O_2 em $2H_2O$ (SHEEHAN et al., 2001). Alta concentração de H_2O_2 resulta em morte celular (LAMB; DIXON, 1997), enquanto baixa concentração impede o progresso do ciclo celular (REICHHELD et al., 1999).

A GST é uma proteína solúvel, predominantemente citossólica, constituída de homodímeros ou heterodímeros de 50 kDa, com subunidades de 23 a 29 kDa (DIXON; LAPTHORN; EDWARDS, 2002). Cada subunidade da estrutura dimérica apresenta um sítio ativo com cinéticas independentes (DANIELSON; MANNERVIK, 1985). A enzima possui dois sítios de ligação: o sítio G, ou sítio ligante do tripeptídeo GSH, localizado no domínio N-terminal da proteína e o sítio H, ou o sítio ligante de um substrato eletrofílico hidrofóbico, localizado no C-terminal. O sítio G apresenta alta especificidade, sendo que apenas a GSH e moléculas estruturalmente relacionadas servem como substrato. O sítio H possui uma ampla especificidade para substratos eletrofílicos, que normalmente possuem um sinal químico composto de ligações duplas conjugadas, adjacentes a um grupo aceptor de elétrons (MARRS, 1996). Nos mamíferos, o resíduo de aminoácido conservado para as classes Alpha, Mu e Pi é a tirosina (Tyr); enquanto que em plantas para as classes Phi, Tau, Theta e Zeta é a serina (Ser), sendo esses aminoácidos

conservados relacionados à conjugação da tripeptídeo glutationa (DIRR; REINEMER; HUBER, 1994).

De modo geral, todas as estruturas de GSTs são compostas por dois domínios, o Nterminal formado por três alfa-hélices e quatro folhas beta-pregueadas e o C-terminal formado somente por alfa-hélices (geralmente de quatro a cinco hélices). Baseado em critérios, incluindo similaridade de seqüências de nucleotídeos/aminoácidos; estrutura física dos genes (exemplo, número e posição de íntrons); e propriedades imunorreativas, as GSTs tem sido agrupadas dentro de inúmeras classes, algumas que estão presentes em diversos taxa, enquanto outras são consideradas espécie-específica (FROVA, 2006). Classes de GST foram identificadas em insetos (HAROLD; OTTEA, 1997), em bactérias (ZABLOTOWICH et al., 1995), e em diversas plantas como milho (DIXON; COLE; EDWARDS, 1997; EDWARDS; OWEN, 1996; HATTON et al., 1996; HOLT et al., 1995; JABLONKAI; HATZIOS, 1991; JEPSON et al., 1994; MARRS et al., 1995; MARRS; WALBOT, 1997; ROSSINI et al., 1996; SCARPONI; ALLA; MARTINELLI, 1992), trigo (EDWARDS; COLE, 1996; JABLONKAI; HATZIOS, 1991; MAUCH; DUDLER, 1993; RIECHERS et al., 1996; ROMANO et al., 1993), tabaco (DROOG; HOOYKAAS; VAN DER ZAAL, 1995), soja (ANDREWS et al., 1997; ULMASOV et al., 1995), Arabdopsis thaliana (REINEMER et al., 1996), cevada (ROMANO et al., 1993; WOLF; DIETZ; SCHRODER, 1996), batata (HAHN; STRITTMATTER, 1994), grão-de-bico (HUNATTI; ALI, 1990; 1991), sorgo (DEAN; GROWNWALD; EBERLEIN, 1990; GRONWALD et al., 1987), cravo (MEYER; GOLDSBROUGH; WOODSON, 1991) e cana-de-açúcar (SINGHAL et al., 1991).

As GSTs constituem uma superfamília de proteínas muito antiga, a qual é considerada como descendente do ancestral das tiorredoxinas, responsável pela resposta ao estresse oxidativo (KOONIN et al., 1994). As classes de GST refletem grupos que divergiram em várias fases do

processo evolutivo e hoje são amplamente encontrados nas mais diversas espécies (SHEEHAN et al., 2001). Atualmente são encontrados tipos específicos de GSTs em cada grupo de organismos, o que sugere que o processo de duplicação e evolução acelerou após a radiação dos filos, seguindo um padrão de especificidade relacionada com o taxa (FROVA, 2003). Esta diversificação da superfamília das GSTs citosólicas é considerada um exemplo de divergência evolutiva (ARMSTRONG, 1997). A evolução tem modelado as proteínas de modo a torná-las específica para cada ambiente encontrado na natureza, assim cada enzima apresenta específicidades diferentes para os mais diversos substratos encontrados. As GSTs de plantas são um bom exemplo desta especificidade. As classes Phi e Tau, exclusivas de plantas, sofreram uma extensa duplicação seguida de um processo de divergência, durante a evolução, cada uma apresentando várias isoformas com especificidades diferentes, embora a estrutura terciária apresente uma alta similaridade (FROVA, 2003). Seqüências distintas podem apresentar estruturas semelhantes, isto ocorre em função da estrutura ser mais conservada que a proteína (PONTING; RUSSELL, 2002).

No momento, sete classes de GSTs são reconhecidas em mamíferos, sendo Alpha, Mu, Pi específicas, e Sigma, Theta, Zeta e Omega consideradas comuns em relação a outros taxa. As plantas possuem seis classes, sendo Lambda, Phi, Tau e DHAR (dehidroascorbato redutase) consideradas específicas, e as classes Theta e Zeta comuns aos outros taxa. A classe Delta de GST é considerada específica de insetos, e a Zeta, Theta, Omega e Sigma são consideradas comuns. Em bactéria, a classe específica é a Beta, e a classe Theta e possivelmente outras classes são consideradas comuns em relação ao outros taxa (FROVA, 2006).

As GSTs foram encontradas em todos os organismos aeróbicos, contendo dezenas de membros genes para cada espécie. Por exemplo, em humanos e outras espécies de mamíferos 15 a 20 diferentes genes de GST foram identificados (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005), 25

a 60 em plantas (FROVA, 2003; McGONIGLE et al, 2000; SORANZO et al., 2004; WAGNER et al., 2002), 10 a 15 em bactérias (VUILLEUMIER; PAGNI, 2002), mais de 10 em insetos (RANSON; COLLIN; HEMINGWAY, 1998).

2.2 Glutationa S-transferase em plantas

A classificação das GSTs de plantas foi primeiramente proposta por Droog (1997) e subseqüentemente atualizada baseada na organização do gene (número e posição do íntron), similaridade da seqüência de aminoácido e conservação de resíduos específicos na proteína (EDWARDS; DIXON; WALBOT, 2000). Primeiramente, três classes distintas de GST de plantas foram nomeadas como tipo I (denominação antiga da classe Phi), tipo II (atualmente Zeta) e tipo III (atualmente Tau) [DROOG, 1997]. Logo surgiu uma quarta classe nomeada de Theta pela similaridade com a classe Theta de mamíferos (DIXON et al., 1998). Mais recentemente, duas classes adicionais de GST foram sugeridas: Lambda e um grupo de proteínas dehidroascorbato redutase (DHAR) com atividade dependente de glutationa (DIXON; DAVIES; EDWARDS, 2002; DIXON; LAPTHORN; EDWARDS, 2002).

Portanto, em plantas foram confirmadas e nomeadas seis classes de GST: Phi (GSTF), Tau (GSTU), Theta (GSTT), Zeta (GSTZ), Lambda (GSTL) e DHAR (DIXON; DAVIES; EDWARDS, 2002; DIXON; LAPTHORN; EDWARDS, 2002). A identidade de seqüência entre as classes é via de regra menor que 30%, e dentro das classes maior que 30% (DIXON; LAPTHORN; EDWARDS, 2002). As GSTs são predominantemente citosólicas e em plantas podem constituir mais de 2% das proteínas solúveis (SCALLA; ROULET, 2002). A expressão das diversas classes de GSTs de vegetais é altamente variável de acordo com o tecido e com condições ambientais (SORANZO et al., 2004). As classes das GSTFs, GSTUs, GSTTs, e GSTZs estudadas são compostas de proteínas diméricas solúveis (DIXON; LAPTHORN; EDWARDS, 2002; FROVA, 2003), enquanto que as GSTLs e DHAR são proteínas monoméricas, que diferem de todos os outros membros da família de GST por conter o resíduo de cisteína (Cys) no sítio G, no lugar da serina (Ser) [DIXON; DAVIS; EDWARDS, 2002].

A classe Phi é a principal responsável pela desintoxicação de herbicidas (DIXON; DAVIS; EDWARDS, 2002), embora também esteja envolvida na deposição de antocianina no vacúolo (MUELLER et al., 2000). Em geral, os genes desta classe apresentam dois íntrons em regiões conservadas. As GSTs da classe Tau, foram primeiramente identificadas como sendo induzidos por auxinas, e também tem sido demonstrado estar envolvida na respostas de uma variedade de estresses endógenos e exógenos, incluindo ataque de patógenos, ferimentos, toxicidade de metais pesados e temperatura (EDWARDS; DIXON; WALBOT, 2000). Seus genes contêm apenas um íntron em uma posição conservada. A classe Zeta participa do catabolismo da tirosina através de uma atividade semelhante à maleilacetoacetato isomerase (BOARD et al., 1997; DIXON; DAVIS; EDWARDS, 2002), bem como apresenta atividade semelhante à glutationa peroxidase, ou seja, catalisam a conversão do peróxido em oxigênio e água (BOARD et al., 1997), demonstrada ser induzida por etileno durante a senescência (FROVA, 2003). Geralmente, os genes desta classe contêm de oito a nove íntrons. As GSTs da classe Theta são similares a classe Theta de mamíferos, mostra especificidade única pelo substrato e não apresenta atividade para o CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) substrato considerado universal das GSTs em ensaios de atividade (SHEEHAN et al., 2001). Os genes da classe Theta contêm normalmente seis íntrons. A classe Lambda é um grupo que consiste de duas seqüências de GSTs solúveis relatadas no genoma de Arabidopsis, genes estes contendo neste genoma oito íntrons. As proteínas DHAR também estão presentes em Arabidopsis e os genes possuem dois íntrons em posições conservadas no genoma (DIXON; DAVIES; EDWARDS, 2002; DIXON; LAPTHORN; EDWARDS, 2002).

A padronização da nomenclatura para cada gene de GST foi proposta por Edwards; Dixon e Walbot (2000), sendo a espécie de origem indicada por letra itálica (por exemplo, *Os* para *Orysa sativa*), seguido por GST mais uma letra indicando a classe (F para Phi, U para Tau, Z para Zeta, T pata Theta, L para Lambda) e um número progressivo indicando a ordem de descoberta do gene em cada classe nas espécies. Para enzimas, a subunidade de composição é indicada. Por exemplo, os *OsGSTU1* e *OsGSTU2* são definidos como o primeiro e o segundo gene da classe Tau reportada em arroz, enquanto OsGSTU1-2 indica um heterodímero de arroz com as subunidades U1 e U2.

No genoma de *Arabidopsis thaliana* foram identificados 28 genes de GSTs da classe Tau; 13 para classe Phi; 3 para Theta; 2 genes para a Zeta; 2 para Lambda; e 4 para DHAR (WAGNER et al., 2002). Em milho, baseado em análise de ESTs foi identificado 28 genes de GST para a classe Tau; 12 para classe Phi; e 2 para Zeta, enquanto que em soja; foram identificados 20 para a classe Tau; 4 para Phi; e 1 para a classe Zeta (McGONIGLE et al., 2000). No genoma do arroz, foram identificados 40 genes associados à classe Tau; 16 a classe Phi; 3 a classe Zeta; e 2 a Theta (SORANZO et al., 2004). As classes Phi e Tau de GST são as mais numerosas e consideradas planta-específica (FROVA, 2003). Portanto estimam-se um total de 25 e 42 genes de GSTs para soja e milho baseando-se em dados de ESTs; 61 genes de GST para arroz e 52 genes para *Arabidopsis thaliana*, ambos com o genoma completamente seqüenciado (McGONIGLE et al., 2000; SORANZO et al., 2004; WAGNER et al., 2002).

2.3 GST e metabolismo de desintoxicação de xenobióticos em plantas

As plantas estão expostas a uma grande variedade de agentes ambientais naturais e antropogênicos, potenciais promotores de danos oxidativos celulares, além de produtos citotóxicos gerados pelo próprio metabolismo primário (MARRS, 1996). A ligação das GSTs de

plantas a tolerância ao estresse oxidativo está diretamente relacionada com a indução por ataque de patógenos, etileno, ferimento, ozônio, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido salicílico, herbicida e metais pesados (MARRS, 1996). Os sistemas de desintoxicação encontrados em plantas evoluíram para transformar, metabolizar e eliminar esses compostos citotóxicos dos tecidos. Em condições normais, o sistema antioxidante enzimático, representado pelas enzimas catalase, glutationa redutase, glutationa S-transferase, ascorbato peroxidase guaicol peroxidase e superóxido dismutase, mantém as espécies reativas de oxigênio (ROS) sob controle. Entre os efeitos das ROS está a peroxidação da membrana lipídica e a formação de compostos altamente tóxicos derivado do DNA lesionado (MARRS, 1996). Dentre as enzimas envolvidas neste processo, uma das mais importantes é a GST, que catalisa a conjugação de a uma variedade de substratos hidrofóbicos e eletrofílicos, geralmente citotóxicos, produzindo conjugados solúveis em água destes xenobióticos, o que reduz sua toxicidade na célula (CATANEO et al., 2003). As GSTs fazem parte de um sistema coordenado de desintoxicação de poluentes e pesticidas em plantas, que foi determinado de xenoma, definido como "biossistema responsável pela detecção, transporte e desintoxicação de xenobióticos nas células." O xenoma pode ser composto por duas partes, que são responsáveis pela detecção/sinalização e transporte/desintoxicação (EDWARDS et al., 2005a).

Taxas diferenciais de desintoxicação são determinantes primários da seletividade a herbicida em cultivares, com o metabolismo ocorrendo em quatro fases (OWEN, 2000). A fase I de desintoxicação é a fase típica da reação de oxidação que é carreada por enzimas do sistema citocromo P450 (WERCK-REICHHART; HEHN; DIDIERJEAN, 2000; YUN et al., 2005). A fase II de desintoxicação geralmente caracterizada pela conjugação da molécula hidrofílica usando açúcares ou tióis, que possibilita que o produto final da fase II seja reconhecido pela fase III de transporte. A GST é a enzima que participa da catálise da glutationa (GSH) com o

composto hidrofóbico com propósito de aumentar a sua solubilidade de modo a facilitar seu transporte para o vacúolo (ANDERSON; GRONWARD, 1991; READE; MILNER; COBB, 2004). A fase III de desintoxicação envolve o transporte de moléculas conjugadas para o vacúolo ou espaço extracelular. Os transportadores ABC é o grupo mais comum de transportadores envolvidos nesta fase (BARTHOLOMEW et al., 2002; KLEIN; BURLA; MARTINOIA, 2006). A fase IV de desintoxicação envolve a degradação da molécula conjugada no vacúolo ou no espaço extracelular. As GSTs ocupam um papel central no *xenoma* e são primariamente responsáveis pela rapidez no metabolismo de herbicidas (EDWARDS; DIXON, 2000).

Há dois mecanismos primários de resistência a herbicida em ervas daninha: (i) resistência causada por mutações no sítio alvo do herbicida (resistência sítio-alvo) e (ii) resistência causada por mutações no sítio não-alvo do herbicida (resistência sítio não-alvo). O aumento da expressão dos genes (alvo ou não) pode estar associado aos dois tipos de resistência (DINELLI et al., 2006). A evolução do sítio-alvo resistente depende de repetidos usos de um único herbicida (ou grupo de herbicidas) e/ou a exclusão de outras táticas de controle das ervas daninhas (TRANEL; WRIGHT, 2002). Há efeito de dose no desenvolvimento de resistência a herbicidas, quando uma alta dose de aplicação do herbicida tende a promover o desenvolvimento da resistência no sítio alvo, enquanto que uma baixa dose tende a promover resistência no sítio não-alvo (GARDNER et al., 1998).

2.4 Tolerância a herbicidas em plantas

Os herbicidas representam a classe de agroquímicos mais utilizados na agricultura, chegando a mais de 60% do total deste aplicado mundialmente (SHANER, 2003). Uma das preocupações primárias sobre a utilização dos agroquímicos são os potenciais efeitos tóxicos sobre vários organismos, incluindo os mamíferos. A maioria dos herbicidas não tem ou possuem

toxicidade limitada aos animais, principalmente porque o modo de ação desses compostos afeta vias bioquímicas que não existem em mamíferos, tais como a fotossíntese, biossíntese de aminoácidos essenciais e de clorofilas (SHANER, 2003).

Herbicidas seletivos são aqueles que controlam diversas espécies de ervas daninhas sem causar danos significativos às culturas (HOLT; POWLES; HOLTUM, 1993). A seletividade do herbicida pode ser atribuída a diferenças na sua absorção ou ao método de aplicação (HOLT et al., 1995). No entanto, evidências físiológicas e genéticas indicam que o princípio determinante da seletividade do herbicida em plantas é a habilidade da espécie e/ou genótipo de metabolizar e assim se desintoxicar do herbicida. (MARRS, 1996). Um aumento na freqüente aplicação de um particular herbicida provavelmente pode ser acompanhado por uma resistência ao herbicida (OWEN; ZELAYA, 2005).

De acordo com Mannervik e Danielson (1988), existem enzimas que apresentam à capacidade de metabolizar diversos xenobióticos, entre eles os herbicidas, proporcionando, desse modo, a desintoxicação das plantas. Já foram identificadas em diversas gramíneas, as enzimas GSTs envolvidas diretamente na desintoxicação de herbicidas (EDWARDS et al., 2005b), resultando na formação de um conjugado GSH-herbicida em plantas resistentes a estes compostos (EDWARDS et al., 2005a).

Certos genótipos de milho e sorgo são reconhecidamente tolerantes aos herbicidas Triazina e Cloroacetanilida devido ao fato de conferirem altos níveis de GSTs, que catalisam a conjugação Atrazine-GSH e Cloroacetanilida-GSH, resultando na conversão desses herbicidas a formas atóxicas solúveis em água (MARRS, 1996; CHERIFI et al., 2001; HIRASE; MOLIN, 2002). De forma similar, arroz também se mostrou resistente à ação do herbicida Cloroacetanilida por apresentar altos níveis de GSTs (SCARPONI; DEL BUONO; VISCHETTI, 2003). Esta atividade de desintoxicação de herbicidas é largamente atribuída aos genes da classe Phi (DIXON et al., 2003; EDWARDS; DIXON, 2000; JEPSON et al., 1994; THOM et al., 2002).

Plantas de tabaco transformadas com o gene *GSTF1* de milho, demonstraram maior tolerância ao herbicida Alacloro, comparadas as plantas não transformadas. Estas plantas transgênicas são potencialmente úteis para a fitorremediação (técnica usada para remover ou degradar poluentes do solo e água, utilizando bactérias ou plantas) dos campos contaminados da agricultura com resíduos de herbicidas (KARAVENGELI et al., 2005). Em milho submetido ao tratamento com o herbicida Glifosato, há a indicação da formação de um complexo Glifosato-GSH de toxicidade reduzida (CATANEO et al., 2003), assim como em *Sonchus oleraceus* com relação a Simazina (FRAGA; TASENDE, 2003). Com relação ao herbicida Fluorodifen, espécies como algodão, amendoim, ervilha e soja apresentam grande tolerância aos efeitos tóxicos desse herbicida devido à formação do conjugado Fluorodifen-GSH (MARRS, 1996). Em cevada, foi identificada uma GST da classe Tau fortemente induzida pelo herbicida Paraquat (KUNIEDA et al., 2005).

A atividade das GSTs varia muito também entre genótipos e em relação à especificidade de substratos (MARRS, 1996). Isoformas de GSTs foram caracterizadas em milho, sendo a GSTI (29 kDa) e a GSTIII (26 kDa) homodímeras, com atividade contra CDNB e ao herbicida Alacloro, enquanto que a GSTII (27 e 29 kDa), é heterodímera, induzida por *safeners* contra CDNB e o Alacloro (DIXON et al., 1998). Variações das GSTs entre cultivares podem ser responsáveis pela tolerância diferencial a herbicidas (EDWARDS; DIXON; WALBOT, 2000). Por exemplo, a linhagem de milho GT112, sensível a atrazina revelou possuir menos que 1% da atividade de GST apresentada pela linhagem GT112RfRf, resistente a atrazina (MARRS, 1996).

No genoma de *Arabidopsis thaliana* o herbicida Alacloro determinou um aumento significativo no número de transcritos do gene *AtGSTU26*, mas em relação ao *AtGSTF9* houve

um diminuição na expressão (NUTRICATI et al., 2006). Os genes da classe Tau estão entre os mais expressos na soja e trigo, sendo responsáveis pela ligação da GSH aos herbicidas difeniléters e aril-oxi-fenoxi-propionatos (DIXON et al., 2003; JEPSON et al., 1994; McGONIGLE et al., 2000). Os herbicidas cloroacetamida dimetenamida (RIECHERS et al., 1997), o fenoxapropetil (CUMMINS; COLE; EDWARDS, 1997) e o sulfunilurea (KOEPPE et al., 1997) foram rapidamente desintoxicados via conjugação com o tripeptídeo GSH. O contrário do observado para as demais culturas, a atividade da GST nas folhas de cana-de-açúcar são inibidas pelos herbicidas 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) e 2,4,5-Triclorofenoxiacético (2,4,5-T); mas com o inseticida Hexaclorociclohexano (muito usado na proteção da cultura) a atividade da enzima foi alta (SINGHAL et al., 1991).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

 Caracterizar os genes das diversas classes de GST de cana-de-açúcar por análise filogenética e perfil de expressão em tecidos/órgãos da planta e em genótipos de canade-açúcar contrastantes para o efeito a diversos tipos de herbicidas por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR).

3.2 Específicos

- Identificar todas as seqüências dos genes codificadores da enzima GST de cana-deaçúcar disponíveis no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnological Information -* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/), baseando-se nos 61 genes ortólogos de arroz (SORANZO et al., 2004);
- Classificar os genes codificando as diversas classes de glutationa S-transferase de cana-de-açúcar por meio de análise filogenética em comparação com os genes de GST de arroz;
- Determinar a expressão dos genes das GSTs por análise transcricional via RT-qPCR dos tecidos/órgãos da planta e do tecido foliar das cultivares ('SP87-365' e 'SP80-3280') consideradas contrastantes ao efeito dos herbicidas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP.

4.1 Material vegetal e ensaios

Foram utilizadas plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) micropropagadas na biofábrica do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, SP, cultivadas em bandejas (28 plântulas por bandeja) com substrato estéril de areia e vermiculita (2:1 v:v), por 30 dias. No primeiro ensaio foram coletadas amostras de colmo, inflorescência, limbo foliar, meristema e raiz de plantas cultivadas sem nenhum tratamento. Amostras do meristema foram coletadas da cultivar 'SP87-432'; de colmo foram coletadas da F₁ derivada do cruzamento da 'SP80-180' e da 'SP 80-4966'; e por fim de inflorescência, limbo foliar e raiz foram coletados da cultivar 'SP87-3280'. As amostras vegetais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C para posterior extração de RNA total.

No segundo ensaio, foram coletadas amostras das cultivares 'SP87-365' e 'SP80-3280' (presumivelmente sensível e tolerante a herbicidas, respectivamente), submetidas aos tratamentos com dose inteira recomendada dos herbicidas; 5 L ha⁻¹ Ametryn (triazina; produto comercial *AMETRINA*), 5 L ha⁻¹ Diuron (derivado de uréia; produto comercial *DIURON*), 110 g ha⁻¹ Imazapic (imidazolinona; produto comercial *PLATEAU 70 DG*) e 120 g ha⁻¹ Isoxaflutole (isoxazole; produto comercial *PROVENCE 750 WG*), sendo estes considerados de maior importância para a cultura da cana-de-açúcar. Isoxaflutole e Diuron são herbicidas de aplicação em pré-emergência, pois no campo, ao se repetir à aplicação após o primeiro corte, esses herbicidas agem nas plantas de forma pós-emergente, causando danos severos à cultura. No caso

da Ametryn e Imazapic, os efeitos tóxicos também são expressivos, entretanto, diferentemente dos primeiros, ambos são herbicidas de aplicação em pós-emergência. As aplicações dos herbicidas foram realizadas de uma só vez através de bomba pulverizadora costal. Os procedimentos de escolha e aplicação dos herbicidas foram conduzidos sob orientação do Prof. Dr. Pedro Jacob Christoffoleti (ESALQ / USP – Piracicaba).

Foram utilizados cinco tratamentos (controle + 4 herbicidas) por cultivar, sob condições controladas de casa-de-vegetação. As amostras de tecido foliar de 5 plântulas (por tratamento) nos períodos de 0 e 48 h foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido após a coleta e estocadas a -80°C para posterior extração de RNA total.

4.2 Identificação de genes associados à GST

Foi realizada a busca das diversas seqüências de GST de cana-de-açúcar no banco de dados do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/) utilizando a ferramenta Megablast, baseando-se nos 61 genes ortólogos de arroz (SORANZO et al., 2004) equivalente as quatro classes da enzima (Phi – F; Tau - U; Theta - T; e Zeta - Z). As seqüências que apresentaram alta similaridade (*E* value $\leq 10^{-7}$) em relação aos genes de arroz foram analisadas individualmente no Blast para confirmar sua identidade. Depois de confirmada a identidade das següências de canade-açúcar, foi utilizado dados de Saccharum banco de Gene Index 0 (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/tc ann.pl?gudb=s officinarum) para identificar as sequencias consenso ou agrupamentos de ESTs (clusters ou TC - tentative consensus). Os identificados foram traduzidos ORF Finder consensos no programa (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) ou BCM Search Launcher six-frame translation (http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html), a partir da identificação do melhor quadro de leitura.

4.3 Classificação dos genes de GST por análise filogenética

A partir da identificação dos agrupamentos de ESTs de cana-de-açúcar, as seqüências completas da proteína GST foram utilizadas para a análise filogenética. Alinhamentos múltiplos das seqüências de aminoácidos das GSTs de cana-de-açúcar e arroz foram realizados com o programa ClustalW (http://align.genome.jp/). As árvores filogenéticas foram obtidas utilizando as funções de máxima parcimônia no programa PAUP 4.0b10 (SWOFFORD, 1998), com valores de *bootstrap* indicando a porcentagem em que cada ramo da árvore obteve a formação apresentada (FELSENSTEIN, 1985). A visualização dos fenogramas foram realizadas com o programa TreeView (PAGE, 1996).

Foi realizada outra análise utilizando a ferramenta *Blast 2 Sequences* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi), para determinar qual agrupamento de EST de cana-de-açúcar que melhor pareava com o gene de arroz. A classificação das seqüências de cana-de-açúcar em função dos genes de arroz foi baseada na nomenclatura de GST de plantas proposta por Edwards, Dixon e Walbot (2000).

4.4 Construção de iniciadores para os genes de GST

Depois da classificação, foram desenhados iniciadores (*primers*) direcionadores para a região 3'UTR dos genes de GST de cana-de-açúcar com auxílio do programa *on-line* Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), ajustado com os parâmetros padrão, exceto: tamanho do amplicon variando de 100 a 300 pb; tamanho do primer entre 18 e 22 pb (ótimo a 20 pb); temperatura de anelamento entre 59 e 61°C (ótimo a 60°C); conteúdo GC% entre 40 e 60% (ótimo a 50%); fator de auto-complementariedade máxima inicial de 3,0; fator de auto-complementariedade máxima na região 3' de 0. Dentre os pares de iniciadores obtidos para os gene de interesse, foram selecionados aqueles com melhores características usando o programa

on-line NetPrimer (http://www.premierbiosoft.com/netprimer) em relação à estabilidade e eventual ocorrência de pareamento indesejável, como a formação de alças (*hairpins*), dímeros do mesmo iniciador (*primer-dimer*) e entre o par de iniciadores (*cross dimer*). Os iniciadores específicos sintetizados (Tabela 1) foram ressuspendidos na concentração estoque de 1 μ g μ L⁻¹ em água ultrapura (Milli-Q) estéril e armazenado a -20°C.

Tabela 1 - Descrição dos iniciadores desenhados para os genes de GST de cana-de-açúcar; estão listados com suas respectivas siglas do gene, seqüência dos iniciadores, número de acesso (TC n°), tamanho do amplicon (pb) e presença ou ausência de íntron nas classes de GST em arroz. O acesso é o número de identificação da seqüência (*tentative consensus* - TC) no banco de dados de Saccharum Gene Index.

Gene	Seqüência (5'- 3')	TC n ^o	Amplicon (pb)	Ìntron
ScGSTF2	F: TGAAGGCTTGGTGGGATG R: CGGGGTAGGTTGGCTTATTT	TC24463	216	
ScGSTF3	F: TGGGAAGAAAGAAGGTGGTG R: GCAAATGCAAGCTGGAAGA	TC34616	114	
ScGSTF4	F: CCGCCTGAGTTGACCTTTC R: CCATGCTCTTCACACAACCA	TC56926	159	
ScGSTF5	F: AGGTGCTGGAGGTGTACGA R: GATGGTGAAGTGGCTGAGGT	TC41083	102	+
ScGSTF6	F: TTCTGATCTCGGTCGCAAA R: TTCAATCTCACGGCAAGGA	TC32542	190	
ScGSTF14	F: CGAGCAGAGGAAGAAGGACC R: CGGCGATGGTGAAGTTGT	TC32541	105	
ScGSTF15	F: GTCGTCAGGCTTCATACCGT R: CGAAAGGAAGACACGAGACA	TC32758	115	
ScGSTU1	F: GAGCCTTTTGGGTGAACATC R: GACGCACAACAACAACTAAAC	TC32765	120	
ScGSTU5	F: CAAGAAACGCCTCCAATCC R: ACCCAGAAGTCCAGAAGCAC	TC33535	141	
ScGSTU8	F: GTCAAGACCGACGAGGAGAA R: ACCATGCCACCAAGAAGG	TC36197	155	
ScGSTU13	F: GCGGAGAAGGTGAAGGAGA R: CGAACCAGAACAAGAAGGAGC	TC37214	142	+
ScGSTU17	F: AGGACCTCGCCAACAAGA R: TGAAGATCGGGTACAGAGCA	TC42309	240	
ScGSTU31	F: ATGGTCCCAAGTGAGCAAAA R: CTAAACAAACGGGGCAAGAA	TC41753	129	
ScGSTU39	F: GGGAGGCACCAACTTTCTG R: CCGAAACCCCTTCTACTGCT	TC46054	136	
ScGSTT1	F: GTATCTTGCGTCGGTCTTCC R: CGTCACCTTTCAGCCATTC	TC46876	251	+
ScGSTZ1	F: CTGCGTCCCCATACTGAAA R: GTTACCGTGGAAGGATGGAA	TC34572	108	
ScGSTZ2	F: GGGATAGGGAGCTCACCG R: GGGCATCATTAGGGAAAGAG	TC45273	120	+
ScGSTZ3	F: TCTGAGTTGCCTTCCGTGTT R: TGACGAACTGACGATTGCCT	TC23951	104	
4.5 Clones de EST

Foram escolhidos clones de EST, a partir da seqüência consenso dos genes de GST de cana-de-açúcar no banco de dados de *Saccharum Gene Index*. Foram adquiridos 18 clones de genes codificadores de GST; sendo sete da classe Phi (*F*); sete da Tau (*U*); um da classe Theta (*T*); e três da Zeta (*Z*) [Tabela 2] do Centro Brasileiro de Estocagem de Genes (BCCC- *Brazilian Clone Collection Centre*, Jaboticabal - SP),

Tabela 2 - Descrição dos clones selecionados a partir dos genes de GST de cana-de-açúcar identificados; estão listados com suas respectivas siglas do gene; clone de EST; nome do clone; e tamanho estimado (pb).

Gene	Clone de EST	Nome do clone	Tamanho (pb)
ScGSTF2	SCVPFL3047A04	<i>F2</i>	934
ScGSTF3	SCBGLR1003E05	F3	693
ScGSTF4	SCBGRT3015C11	<i>F4</i>	803
ScGSTF5	SCAGHR1019E10	<i>F5</i>	630
ScGSTF6	SCJFRZ3C03H05	<i>F6</i>	678
ScGSTF14	SCRUSB1062A08	<i>F14</i>	530
ScGSTF15	SCJFST1014G04	F15	880
ScGSTU1	SCBFSD1036B07	U1	809
ScGSTU5	SCSGLV1008B02	<i>U5</i>	586
ScGSTU8	SCCCRT2C02A12	U8	618
ScGSTU13	SCAGRT2041B09	<i>U13</i>	667
ScGSTU17	SCJLRT1006C02	<i>U17</i>	708
ScGSTU31	SCVPCL6047H05	<i>U31</i>	679
ScGSTU39	SCRURT2009C11	<i>U</i> 39	480
ScGSTT1	SCEPLR1030D09	T1	596
ScGSTZ1	SCCCFL8003C02	Z1	802
ScGSTZ2	SCJLRT1018E06	Z2	580
ScGSTZ3	SCEQSD2075C01	Z3	730

Após o recebimento, as colônias isoladas da placa de cada clone foram transferidas para 5 mL de meio líquido LB (Luria-Bertani, composto de 10 g L⁻¹ triptona, 10 g L⁻¹ NaCl e 5 g L⁻¹ extrato de levedura) com 100 µg mL⁻¹ ampicilina, e mantidas em agitação (150 rpm) constante a 37°C durante aproximadamente 17 h. Após o crescimento das colônias, 1,5 mL do foi submetido à centrifugação por 1 min a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado, e esse procedimento repetido por mais uma vez para aumentar o rendimento da minipreparação (protocolo de extração de DNA plasmidial por lise alcalina). Em seguida, o precipitado de células foi totalmente ressuspenso em 200 µL de Solução I (50 mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM Na₂·EDTA pH 8,0) com a ajuda do "vortex" e incubado a temperatura ambiente por 10 min. No próximo passo foi acrescentado 200 µL de Solução II (0,2 M NaOH e 1,0% SDS), misturado por inversão e incubado no gelo por 5 min. A seguir, foi acrescentado 150 µL de Solução III (3 M KOAc pH 5,5), também misturado por inversão e incubado no gelo por 5 min. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 12.000 g por 10 min. Após a mesma, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, aos quais foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e novamente centrifugado por 1 min. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo, adicionado 1 mL de 100% etanol, misturado por inversão e incubado a -20°C por aproximadamente 30 min. Depois de incubado, o precipitado foi centrifugado a 12.000 g por 5 min e o líquido sobrenadante foi descartado. Foi realizada a lavagem do precipitado com 500 µL de 70% etanol e novamente centrifugado a 12.000 g por 5 minutos. O precipitado (DNA plasmidial) foi deixado à temperatura ambiente até a secagem, e posteriormente ressuspendido em 30 µL de TE (10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) com RNAse (50 µg mL⁻¹).

O DNA plasmidial foi verificado por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão SB (10 mM NaOH pH 8,5; ajustado com ácido bórico) [BRODY; KERN, 2004] a 3 V cm⁻¹. As

amostras foram coradas com *SYBR green* 10X (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xilenocianol; e 15% ficol tipo DL) e visualizadas por iluminação UV (302 nm). A aquisição da imagem do gel foi feita com a câmera digital e processada no programa Kodak Digital Science 1D (Kodak, Japão). Após a confirmação da integridade do DNA plasmidial obtido por lise alcalina, a presença e identificação do clone de GST completo foi confirmada por seqüenciamento.

4.6 Extração de DNA genômico

As folhas tenras da cultivar 'SP80-3280' foram colhidas para extração de DNA, utilizando o protocolo proposto por Al-Janabi, Forget e Dookun (1999). Resumidamente, cerca de 1,5 g de folhas do palmito foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para o tubo de 50 mL tipo Falcon, contendo 6 mL de tampão de homogeneização (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 2,2 M NaCl; 2% CTAB; 0,06% sulfito de sódio). Ao extrato foram adicionados 2 mL de 5% N-lauryl-sarcosine, 2 mL da solução 10% PVP (polivinilpirrolidona), 2 mL de 20% CTAB pré-aquecido. Os tubos foram misturados por inversão e incubados a 65°C por 60 min em banho-maria, agitando-se ocasionalmente. As amostras foram então resfriadas a temperatura ambiente, e um volume igual de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado. A mistura foi agitada manualmente por 2 min e em seguida centrifugada a 10.000 g por 10 min. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e um volume igual de isopropanol gelado, seguido de 2 mL de 5 M NaCl foram acrescentados. A solução foi incubada a -20°C por pelo menos 1 h. O DNA precipitado foi centrifugado a 10.000 g por 10 min, lavado com 10 mL de 70% etanol e novamente centrifugado. O pellet foi transferido para um tubo de 1,5 mL e ressuspenso em 200-400 µL de TE (10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) com RNAse (10 μ g mL⁻¹). Os tubos foram incubados a 37°C até a dissolução completa do DNA genômico e armazenado a -20°C.

4.6.1 Quantificação do DNA genômico

A integridade do DNA genômico extraído foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8% - em tampão SB (BRODY; KERN, 2004) a 2 V cm⁻¹, aplicando-se uma alíquota de 2 μ L do DNA de cada amostra. Para determinar a concentração do DNA genômico extraído, foi realizada quantificação utilizando-se uma alíquota de 5 μ L do genômico, adicionando-se o corante H33258 (Hoescht[®]) para leitura fluorescência em um fluorímetro DyNA Quant 200 (GE Healthcare Bio Sciences). O DNA genômico foi diluído para a concentração de 100 ng μ L⁻¹.

4.7 Extração de RNA total

Foi realizada a extração do RNA total do limbo foliar e outros tecidos de cana-deaçúcar, com cerca de 200 mg das amostras seguindo as especificações do fabricante de Trizol (Invitrogen[®]), que consiste em uma solução mono-fásica de isotiocianato de guanidina/fenol. Para o procedimento de extração do RNA, bem como para as etapas que se seguiram, foram tomados os devidos cuidados à manutenção da integridade do mesmo. Para tanto, todos os utensílios utilizados foram previamente tratados com água ultrapura (Milli-Q) estéril adicionada de dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,01% e submetidos à esterilização em autoclave por 40 min a 120°C e 1 atm de pressão.

Cada amostra foi macerada em nitrogênio líquido com a adição de um antioxidante no momento da maceração, o polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 5%. Ao macerado foi adicionado 1 mL de Trizol (Invitrogen[®]), submetendo-se à agitação em vórtex por 30 s. O extrato foi

homogeneizado e incubado por 5 min a temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Em seguida centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, a mistura foi separada em uma fase inferior vermelha (fase fenolclorofórmio), interfase e a fase aquosa superior incolor. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, onde foram acrescidos 200 μ L de clorofórmio, que foi emulsificado sob agitação, seguido de incubação a temperatura ambiente por 5 min. A emulsão foi então centrifugada a 12.000 g por 15 min a 4°C; transferida novamente para um novo tubo e o RNA foi precipitado com 500 μ L de isopropanol, por 10 min a temperatura ambiente. Seguiu-se uma centrifugação nas mesmas condições, sendo o sobrenadante descartado cuidadosamente e adicionando-se ao precipitado (*pellet*) 1 mL de 75% etanol gelado preparado com água ultrapura (Milli-Q) estéril tratada com DEPC a 0,01%, passando por nova agitação e centrifugação a 7.500 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem total, e então foram ressuspendidas em 50 μ L de água ultrapura (Milli-Q) estéril tratada com DEPC a 0,01% e mantidas em freezer a -80°C até o procedimento das etapas seguintes.

4.7.1 Quantificação de RNA total

A integridade do RNA total extraído foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,2 % - tampão SB (BRODY; KERN, 2004) a 3 V cm⁻¹, aplicando-se uma alíquota de 2 μ L do RNA total de cada amostra. Para a determinação da concentração e pureza do RNA total extraído, uma alíquota de 2 μ L foi retirada para leitura da densidade óptica no espectrofotômetro Smarspech 3000 (BioRad[®], Hercules, CA, EUA) em 260 nm e razão de 260/280 nm, respectivamente.

4.7.2 Tratamento com DNAse

Depois da quantificação, cerca de 2 μ g do RNA extraído de cada amostra foi submetido a tratamento com a enzima DNAse I (Fermentas Life Sciences[®]). Para tanto, seguiu-se as especificações do fabricante utilizando-se 1 U de DNAse I acrescida de tampão apropriado, 2 U de RNAse "out" (Invitrogen[®]) e água ultrapura (Milli-Q) estéril tratada com DEPC a 0,01% para um volume final da reação de 10 μ L. O tubo foi incubado no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) a 37°C por 30 min. Em seguida foi adicionado 1 μ L de 25 mM EDTA, incubado 65°C por 10 min e seguido a 4 °C para a inativação da enzima.

4.7.3 Síntese de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se 2 µg do RNA tratado com DNAse, seguindo as especificações do kit Improm-IITM Reverse Transcriptase (Promega[®]), adicionado-se 500 ng do iniciador poli-T (oligo-dT 18 pb) e água ultrapura (Milli-Q) estéril tratada com DEPC a 0,01% para volume final de 5 µL. O RNA foi desnaturado a 70°C por 10 min e resfriado a 4°C por 5 min. Em seguida, foi adicionado 3 mM de MgCl₂; 0,5 mM de dNTPs ; 2 U de RNAse "out" (Invitrogen[®]); 1 U da enzima Improm-IITM *Reverse Transcriptase* em tampão apropriado; e água ultrapura (Milli-Q) estéril tratada com DEPC a 0,01% para un volume final da reação de 15 µL. A reação de transcrição reversa foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições de termociclagem: 25° C por 5 min, 42° C por 60 min e 70°C por 15 min; depois armazenada a -20°C.

4.7.4 Análise da identidade dos iniciadores por RT-PCR

Com o objetivo de certificar a identidade de amplificação dos iniciadores dos genes de GST de cana-de-açúcar (Tabela 1) a serem utilizados nas análises de RT-qPCR, foi conduzida a reação de amplificação no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) visando a purificação, clonagem e seqüenciamento do produto obtido dos amplicons. O volume total da PCR foi de 25 μ L; adicionando-se 1 μ L do cDNA tratado com DNAse na diluição 1:10 (v:v) [*pool* das amostras do 2º ensaio]; 0,2 mM de dNTPs; 0,2 μ M de cada iniciador; 2 mM de MgCl₂; 1 U da enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em tampão apropriado; e água ultrapura (Milli-Q) estéril. A termociclagem foi conduzida a 94°C por 4 min; 45 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s; e 72°C a 3 min.

4.7.5 Clonagem e transformação gênica

Cerca de 25 μ L de cada amostra amplificada foi separado eletroforeticamente em gel de agarose 1,0 % - tampão SB (BRODY; KERN, 2004) a 3 V cm⁻¹. Após a separação no gel, a banda obtida foi isolada com o auxílio de um bisturi esterilizado para purificação empregando o kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (Amersham Biosciences). Verificou-se a integridade do produto purificado, submetendo o mesmo novamente à eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão SB a 3 V cm⁻¹. Após a quantificação, foi realizada a ligação do amplicom purificado em no vetor de clonagem pGEM-T Easy PCR Product Cloning kit (Promega) seguindo as especificações do. A ligação foi mantida a 8°C por 17 h. Após esse período, 2 μ L da ligação foram transferidos para um tubo contendo 40 μ L células competentes de *E. coli* DH10B. Posteriormente, utilizou-se a técnica de eletroporação das bactérias, utilizando-se um eletroporador modelo micropulser – BioRad[®] e em cubetas de 0,2 μ m foi aplicado um

pulso de corrente elétrica de 1,8 kV durante 3,4 s. Logo em seguida, foram transferidas para um tubo contendo 1 mL de meio líquido LB e mantidas durante 1 h em agitação constante a 37° C. Procedeu-se a uma centrifugação por 5 min a 2.000 *g* para a sedimentação das bactérias e o sobrenadante foi descartado. Um volume de 100 µL de célula foi plaqueado em meio sólido LB contendo 100 µg mL⁻¹ de ampicilina; adicionado de 40 µL de 100 mM IPTG (isopropil β-D-thiogalactopiranosidae); e 25 µL de 120 mM X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosideo). As placas foram mantidas a temperatura de 37° C por 17 h para promover o crescimento e isolamento de colônias contendo o inserto do fragmento de interesse. As colônias brancas isoladas foram transferidas para 5 mL de meio líquido LB com 100 µg mL⁻¹ de ampicilina, e mantidas em agitação constante a 37° C durante aproximadamente 17 h. Após o crescimento das colônias; 1,5 mL do volume foi submetido à centrifugação por 1 min a 12.000 *g* a 20°C. O sobrenadante foi descartado, e esse procedimento repetido por mais uma vez para aumentar o rendimento da minipreparação (protocolo de extração de DNA plasmidial por lise alcalina).

Para a verificação do DNA plasmidial foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão SB. Após a confirmação da integridade do DNA plasmidial por eletroforese, a identidade das seqüencias de GSTs (amplicom) clonadas no vetor foram confirmadas por seqüenciamento.

4.8 Seqüenciamento e análise dos resultados

Amostras de DNA plasmidial (clones de ESTs e as seqüências de GST clonadas no vetor) foram amplificadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 em reações de 10 l contendo 100 ng de DNA plasmidial; 3 µL de 2,5X tampão *Save Money* (200 mM Tris-HCl, pH

9.0; 5 mM MgCl₂.6H₂O); 1 μ L do kit *DYEnamicTM ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences[®]); 0,25 μ M do iniciador universal T7; e água ultrapura (Milli-Q) estéril. A reação de seqüenciamento foi estabelecida com o seguinte perfil: 30 ciclos de 20 s a 95°C; 15 s a 50°C; 1 min a 60°C, finalizando com 10 min a 4°C. Os produtos amplificados foram precipitados com 60 μ L de 100% etanol e 2 μ L de 3 M acetato de sódio, centrifugados por 45 min a 8.000 *g* a 4°C, seguido por lavagem com 150 μ L de 70% etanol, centrifugado novamente por 15 min e a secagem do *pellet* foi realizada a 37°C por 1 h. O precipitado foi então ressuspenso em tampão de seqüenciamento (80% v/v formamida deionizada; 20% *loading buffer*), para carregamento em gel de poliacrilamida para análise em seqüenciador automático ABI-3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA. USA), gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Sui Mui Tsai (CENA, Piracicaba).

Os cromatogramas gerados foram examinados, para qualidade e presença de vetor com o programa Phred/Phrap/Crossmatch (EWING; GREEN, 1998; EWING ET AL., 1998), agrupadas com o Cap3 (HUANG; MADAN, 1999) e as seqüências resultantes foram submetidas à busca por similaridade no GenBank (nr) e no *Saccharum Gene Index* através de *BlastN* e *BlastX* (McGINNIS; MADDEN, 2004) para identificação de eventuais anotações presumíveis.

4.9 Amplificação dos clones de EST com os iniciadores dos genes

Depois de confirmada a especificidade dos clones, foi realizada amplificação no termociclador GeneAmp PCR System 9700 empregando os 18 iniciadores dos genes de GST (Tabela 1) com o DNA plasmidial dos 18 clones de EST (Tabela 2) para determinar a especificidade de cada clone com seu respectivo iniciador. O volume total da PCR foi de 25 μ L contendo-se 100 ng de DNA plasmidial; 0,2 mM de dNTPs; 2 mM de MgCl₂; 0,2 μ M de cada

iniciador; 1U de enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em tampão apropriado; e água ultrapura (Milli-Q) estéril. A termociclagem foi conduzida a 94°C por 4 min; seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s; e finalizando a 72°C por 3 min. O produto da PCR foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1,4 % em tampão SB a 3 V cm⁻¹.

4.10 Amplificação dos cDNAs e genômico com os iniciadores dos genes

Como o objetivo de observar a presença de íntron nas seqüências genômicas de cana-deaçúcar, foi realizado reação de amplificação com 1 μ L do cDNA 1:10 (v:v) [*pool* das amostras do 1º ensaio]; ou 1 μ L do cDNA 1:10 (v:v) [*pool* das amostras do 2º ensaio]; ou 1 μ L do DNA genômico 100 ng ('SP80-3280'). O volume total da PCR foi de 25 μ L adicionando-se 0,2 mM de dNTP; 2 mM de MgCl₂; 0,2 μ M de cada iniciador (Tabela 1); 1U de Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em tampão apropriado; e água ultrapura (Milli-Q) estéril. A termociclagem foi conduzida a 94°C por 4 min; seguido de 45 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s; e finalizando a 72°C por 3 min. Foi utilizado 25 μ L do produto da PCR fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,4 % em tampão SB.

4.11 Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo

As reações de PCR quantitativo em Tempo Real foram conduzidas empregando SYBR Green[®] (Molecular Beacons) no sistema de RotorGene-3000 (Corbett Research). A reação de amplificação foi realizada num volume final de 10 μ L, contendo 1 μ L do cDNA diluído (v/v); 0,5 μ M de cada iniciador; 5 μ l de *Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-UDG 2X* (Invitrogen); e água ultrapura (Milli-Q) estéril. O perfil da reação foi estabelecido com duas etapas constantes

de: 50°C por 2 min e 95°C for 2 min; seguido de 45 ciclos de 95°C por 20 s, 60°C for 30 s. Um protocolo de dissociação foi adicionado ao final da termociclagem, ajustado de 72°C a 95°C (curva de *melting*), determinando a curva de dissociação dos produtos da PCR.

Todos ensaios de RT-qPCR incluíram amostras em triplicatas (10^{-1}); controle negativo (água ultrapura estéril como DNA molde) em duplicatas e o estabelecimento de curva padrão composta de triplicatas das diluições seriais (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) do *pool* de cDNA das amostras. Foram realizados dois ensaios para validar a expressão relativa dos genes de GST de cana-deaçúcar em relação ao gene de referência (*housekeeping gene*). No primeiro ensaio foi utilizado cDNA das amostras de colmo, inflorescência, limbo foliar, meristema e raiz. Para a determinação da curva padrão foi utilizado diluições seriais do *pool* de cDNA das amostras dos tecidos/órgãos. Como genes de referência foram utilizados os genes de cana-de-açúcar ortólogos aos que codificam as proteínas de arroz β -actina (Actina), Tubulina β -2/ β -3 (Tubulina), poliubiquitinas 1 e 2 (UbiQ) e glyceraldeido-3-fosfato desidrogenase/citossólica (GAPDH) [ISKANDAR et al., 2004] e a proteína ribossômica *rpl35-4* (CALSA JR; FIGUEIRA; 2007), mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Genes referência testados, com seqüência dos iniciadores, número de acesso (TC n°), tamanho do amplicon (pb) e presença ou ausência de íntron no genoma de arroz. O acesso é o número de identificação da seqüência (*tentative consensus* - TC) no banco de dados de *Saccharum Gene Index*.

Gene	Inicia	TC nº	Amplicon	Íntron	
Gene	Foward	10 1	(pb)	Intron	
Actina	CTCAACCCCAAGGCTAACAG	GGCATGAGGAAGGGCATAA	TC23717	195	?
GAPDH	CCGTCAACGACCCCTTCAT	GCAGCCTTGTCCTTGTCAGT	TC64714	236	?
Tubulina	CTCCACATTCATCGGCAACTC	TCCTCCTCTTCTTCCTCCTCG	TC48524	103	?
UbiQ1	AGCCTCAGACCAGATTCCAA	AATCGCTGTCGAACTACTTGC	TC56495	158	-
UbiQ2	CTTCTTCTGTCCCTCCGATG	TCCAACCAAACTGCTGCTC	TC56667	159	-
rpl35-4	CTGAAGACGGAGAGGGAAAA	GGCGAAGAGAAACTAACAC	TC57186	264	?

No segundo ensaio foi utilizado cDNA do tecido foliar das cultivares 'SP87-365' e 'SP80-3280' aos diversos herbicidas, nos tempos de 0 e 48 h após aplicação. Para a determinação da curva padrão foi utilizado diluições seriais do *pool* de cDNA das cultivares tratadas por tempo (0 e 48 h) de exposição aos herbicidas. Como genes de referência foram utilizados os genes de cana-de-açúcar ortólogos aos que codificam as proteínas de arroz β -actina (Actina), Tubulina β -2/ β -3 (Tubulina) [ISKANDAR et al., 2004] e a proteína ribossômica *rpl35- 4* (CALSA JR; FIGUEIRA; 2007). A aquisição dos dados em tempo real foi efetuada com o programa RotorGene Real-Time Analysis 6.0 (Corbett Research, Austrália), o qual forneceu os valores de ciclo-limite de leitura (C_T, ou *cycle threshold*), eficiência da PCR (E) e R² associada.

4.11.1 Delineamento experimental e estabilidade gênica

No primeiro ensaio, a expressão gênica foi avaliada em triplicatas de cada amostra dos cinco tecidos/órgãos para cada um dos 14 pares de genes e designada com os seguintes símbolos: colmo (C), inflorescência (I), limbo foliar (L), meristema (M) e raiz (R). No segundo ensaio, a expressão gênica foi avaliada em triplicatas de cada amostra dos cinco tratamentos (controle + 4 herbicidas) por cultivar para um dos 10 pares de genes de GST e designada com os seguintes símbolos: herbicida Ametryn (A), Diuron (B), Imazapic (C) e Isoxaflutole (D).

A análise da curva padrão da diluição serial do *pool* de cDNA das amostras serviu como referencial para calcular as concentrações de transcritos com base em um modelo de regressão linear, valores logarítmicos das concentrações e com o *threshold*, ou seja, o limite de detecção de estabelecido em 10% da fluorescência. Esses valores de concentrações serviram para calcular a variações e a estabilidade de expressão gênica, e assim avaliar os candidatos a genes de referência. O coeficiente R² resultante foi considerado como ideal com valores de R² acima de

0,98; o valor de M (inclinação da reta) entre -3 e -4 foi considerado aceitável, sendo seu ótimo em torno de 3,6. A eficiência ideal deve ter valor igual a 1, o que corresponde a uma eficiência de amplificação = 2 (dobrando a cada ciclo), ou seja, 100%, no entanto, foi considerado satisfatório valores entre 90 e 110%.

Com o auxílio do programa *BestKeeper* (PFAFFL et al., 2004) disponível em http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html, o gene de referência ideal para os ensaios foi estabelecido. Para a normalização em cada uma das amostras analisadas, calculou-se a variação quantitativa de expressão dos genes de GST (alvo) de forma relativa ao gene referência com o auxílio do programa *Relative Expression Software Tool* (REST-384), de autoria de Pfaffl; Horgan e Dempfle (2002) disponível em http://www.gene-quantification.com/rest.html. A utilização deste programa permitiu uma estimativa de expressão gênica com o nível de significância dos genes alvo em relação ao gene de referência.

4.12 Análise por Southern blot

4.12.1 Purificação dos clones de EST

Foram escolhidos quatro clones de GST (*F4*; *U1*; *T1*; e *Z3*) representando cada uma das classes para serem utilizados como sondas na análise de *Southern*, considerando na seleção as seqüências mais próximas da região 5' do consenso. As sondas foram preparadas a partir da purificação de produtos amplificados por PCR, seguido de digestão para remoção de pequenos trechos do vetor. Os clones foram amplificados por uma reação de PCR de 25 μ L de volume final, contendo 100 ng de DNA plasmidial; 0,2 mM de dNTP; 2 mM de MgCl₂; 1 U de Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) com tampão apropriado; 0,2 μ M de cada iniciador (T7 e SP6);

e água ultrapura (Milli-Q) estéril. A amplificação foi conduzida a 94°C por 4 min; seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s; e 3 min finais a 72°C. O produto foi quantificado em gel de 1,4 % em tampão SB, e o restante da reação (20 μ L) foi digerido com enzimas *Eco*RI e *Hind*III (1 U de enzima por μ g de DNA - Fermentas[®]) por 2 h a 37°C. As reações de digestão foram aplicadas em gel de agarose 1% e os fragmentos referentes às sondas foram visualizados por iluminação UV (302 nm), cortados do gel, e purificados utilizando o kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (Amersham Biosciences). A concentração de DNA de cada sonda purificada foi determinada indiretamente pelo programa Kodak Digital Science 1D (Kodak, Japão). As sondas foram então diluídas na concentração de 10 ng μ L⁻¹, para serem utilizadas nas reações de marcação radioativa.

4.12.2 Digestão do DNA genômico

Vinte e cinco µg de DNA genômico de cana-de-açúcar ('SP80-3280') foram digeridos com as enzimas *Eco*RI, *Dra*I e *Hind*III (1 U de enzima por µg de DNA - Fermentas[®]) a 37°C por 16 h. A seguir, o DNA digerido foi precipitado com 750 µL de 100% etanol e 30 µL de 5 M NaCl, incubado a -20°C *overnight*. As amostras foram centrifugadas (microcentrífuga Eppendorf 5415R) a 4°C por 20 min, lavadas em 500 µL de 70% etanol, e novamente centrifugadas a 4°C por 20 min. Após secagem, o DNA foi ressuspenso em 30 µL de TE (10 mM Tris HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0). Amostras digeridas, juntamente com 1 µg do marcador de peso molecular (λ -*Hin*dIII); 1 ng da sonda *T1* e *Z3* (controle positivo) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (40 mM Tris acetato; 2 mM EDTA) por 20 h a 1 V cm⁻¹. Após a eletroforese do gel foi fotografado com a câmera digital e processada no programa Kodak Digital Science 1D (Kodak, Japão).

Após a eletroforese, o gel foi tratado com a solução de depurinação (0,125 M HCl) por 10 min, lavado rapidamente com água ultrapura (Milli-Q). A seguir, foi adicionada a solução de desnaturação (1,5 M NaCl e 0,5 M NaOH) por 30 min, lavada novamente com água ultrapura (Milli-Q), e por último, adicionada a solução de neutralização (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7.0) por 30 min. A transferência por capilaridade do DNA para a membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham), foi feita com a solução 10X SSC (1,5 M NaCl; 150 mM Na₃Citrato.2H₂O) por 18 h. Após a transferência, a membrana foi seca a 80°C por 30 min e o DNA fixado com tratamento de UV calibrado a 70.000 μ J cm⁻² de membrana, usando o programa padrão do forno de ultra-violeta Hoffer UVC 500 (Amersham).

4.12.3 Marcação radioativa (³²P) e purificação da sonda

A metodologia seguiu basicamente as recomendações do fabricante do kit *Rediprime* II (GE Healthcare Bio Sciences) para a marcação radioativa através do método *Random Hexamer Labellind* (FEINBERG; VOGELSTEIN, 1983). Para marcação da sonda, 50 ng de DNA foi desnaturado a 100°C por 5 min e mantido no gelo por 5 min. Após uma rápida centrifugação, o volume foi transferido para o tubo de reação do kit *Rediprime* II, adicionando-se 3 μ L de *Redivue* (30 μ Ci, [α -³²P]-dCTP, GE Healthcare Bio Sciences), com pipetagens repetidas. A reação de incorporação do [α -³²P]-dCTP foi mantida em temperatura ambiente por 1 h e 30 min, posteriormente foi adicionado 5 μ L de 0,2 M EDTA para cessar a reação. E em seguida a sonda marcada foi purificada em uma microcoluna *ProbeQuant* G-50 (Amersham Biosciences) para eliminação dos nucleotídeos não incorporados. Após a purificação, a sonda foi desnaturada a 100°C por 5 min, e colocada no gelo por 5 min.

4.12.4 Pré-hibridização e hibridização

Inicialmente, as membranas foram umedecidas com solução de 2X SSC, acondicionadas nas garrafas e pré-hibridizadas a 42°C, por um período mínino de 2 h em 15 mL de tampão contendo 25 mM KPO₄; 5X SSC; 1% SDS; 5X Solução Denhardt's (Solução 50X: 1% de Ficoll 400, 1% PVP e 1% BSA); 50% formamida deionizada; e 100 µg mL⁻¹ de ssDNA de esperma de salmão desnaturado. O tampão de hibridização utilizado é igual ao de pré-hibridização acrescido de 10% PEG (polietileno glicol 8000) e 50 ng de sonda marcada purificada. O tempo de hibridização foi de 18 h.

4.12.5 Lavagens das membranas

Após a hibridização, as membranas foram submetidas a três soluções de lavagens: tampão primário (2X SSC + 0,01% SDS) por 10 min, tampão secundário (1X SSC + 0,01% SDS) por 7 min e o tampão terciário (0,1X SSC + 0,01% SDS) por 5 min, todas lavadas a temperatura ambiente. Após as lavagens, a membrana foi selada em plástico transparente e exposta ao filme permanente (*Image Plate*, Fujifilm, Japão), deixada em cassete (BAS Cassete 2340, Fujifilm, Japão) por tempo em função do sinal detectado (cpm), com exposição variando de 3 horas até 2 dias. As imagens geradas foram obtidas com *scanner* Storm® 860 Gel (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences).

Para a re-utilização das membranas, a sonda era retirada tratando a membrana com solução fervente de 0,1 % SDS, deixando que esta atingisse a temperatura ambiente. A membrana era imersa rapidamente em 2X SSC e a remoção da radioatividade era determinada com o uso de contador Geiger. A adição do 0,1 % SDS fervente era repetida até que o sinal radioativo gerado fosse insignificante (< 200 cpm).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação e classificação de genes associados à GST

identificados Saccharum Foram no banco de dados de Gene Index (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/tc ann.pl?gudb=s officinarum) 31 agrupamentos (clusters ou TC - tentative consensus) e 26 ESTs individuais não agrupados (singletons) de canade-açúcar, baseando-se busca mediante ferramenta MegaBlast а na (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST) usando os 61 genes ortólogos de GST equivalentes as quatros classes (Phi - F, Tau - U, Theta - T e Zeta - Z) relatados em arroz (SORANZO et al., 2004). As següências de cana-de-açúcar identificadas totalizaram 489 transcritos (0,19%) das 255.635 ESTs disponíveis, distribuídas entre 24.711 agrupamentos e 53.795 singletons, originadas de diversos genótipos, tecidos e condições; dados depositados até outubro de 2004.

Para classificar os genes de GST de cana-de-açúcar identificados, foi realizada uma análise filogenética empregando as seqüências traduzidas dos 31 agrupamentos, 26 *singletons* de cana-de-açúcar e 61 dos genes de arroz. Os TCs e *singletons* de cana-de-açúcar se agruparam aos genes de GST de arroz baseados em valores de re-amostragem com reposição aleatória dos dados (*bootstrap*), que revelaram a consistência interna da topologia da árvore consensual (Figura 1). Dos 31 agrupamentos de cana-de-açúcar, 13 (derivados de 313 *reads*) foram classificados como pertencentes à classe Phi, e equivalentes a sete genes da classe Phi de arroz (do total de 16). Doze agrupamentos foram classificados como genes da classe Tau, derivados de 141 *reads*, e equivalentes a 15 genes de Tau de arroz (do total de 40). Foram também encontrados dois genes da classe Theta, derivado de seis *reads* equivalente a dois da Theta de arroz (do total de dois); e

quatro genes de GST pertencentes à Zeta, formados com 31 *reads*, e equivalentes a três genes da classe Zeta de arroz (do total de três). Dos 26 *singletons* de cana-de-açúcar, 12 foram classificados como genes de GST da classe Phi; 13 como da classe Tau e 1 classificado com gene de GST da classe Zeta equivalentes aos genes arroz.

Com o objetivo de classificar somente as seqüências completas da proteína GST com 250 a 350 aminoácidos, uma segunda árvore consensual foi gerada utilizando os 31 agrupamentos de cana-de-açúcar e os 61 genes de arroz (Figura 2). Os *singletons* não foram incluídos nesta análise, porque quando alinhados na ferramenta *Blast 2 Sequences* do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) aos seus respectivos agrupamentos, mostraram-se fazer parte do mesmo grupo, apresentando pequenas diferenças entre as seqüências (dados não mostrados). Os *singletons* identificados traduziam seqüências de aproximadamente 100 aminoácidos, e que não se agruparam automaticamente aos TCs possivelmente devido aos critérios estatísticos estabelecidos para o agrupamento. Na árvore consensual foi observada à formação de quatro grupos distintos referentes às classes de GST (Phi, Tau Theta e Zeta); com valor de *bootstrap* (100%) indicando a consistência interna na análise (Figura 2).

As classes Theta (*GSTT*) e a Zeta (*GSTZ*) são relatadas tipicamente em mamíferos, enquanto que as classes Tau (*GSTU*) e Phi (*GSTF*) são planta-específica (DIXON et al., 1998; DROOG, 1997; EDWARDS; DIXON; WALBOT, 2000). As classes Phi e Tau foram as mais representativas em termos de número de agrupamentos de ESTs em cana-de-açúcar em relação a classes Theta e Zeta (Figura 2). Em comparação, o genoma de *Arabidopsis thaliana* contém 52 genes de GST, sendo as classes Phi e Tau representadas por 13 e 28 genes cada, respectivamente, e as classes Theta, Zeta, Lambda e DHAR por 3, 2, 2 e 4 genes respectivamente (FROVA, 2006; WAGNER et al., 2002). Em milho, foram identificados por meio de análise de ESTs, 42 genes de GST, sendo 12 associados à classe Phi (tipo I), 28 a classe Tau (tipo III) e dois a Zeta (tipo II), e nenhum representante da classe Theta (McGONIGLE et al., 2000). O genoma da soja contém pelo menos 25 genes de GST avaliado por ESTs, sendo quatro representados pela classe Phi (GST tipo I), 20 pela Tau (tipo III) e 1 pela classe Zeta (tipo II) [McGONIGLE et al., 2000]. Na seqüência completa do genoma do arroz, foram identificados 61 genes associados à GST, sendo 16 representados pela classe Phi, 40 pela classe Tau, 2 pela Theta e 3 pela classe Zeta (SORANZO et al., 2004).

Considerando que vários TCs de cana-de-açúcar se agruparam com os mesmos genes de arroz (Figura 2), foi conduzida uma análise mais detalhada baseada na similaridade das seqüências, permitindo que os 31 grupos de cana identificados fossem finalmente classificados em 18 agrupamentos únicos, totalizando 355 transcritos (Tabela 4). Entre estes 18 agrupamentos, sete foram classificados como pertencentes à classe Phi; sete como a classe Tau; um como Theta; e três como Zeta. Os 18 genes de cana-de-açúcar identificados foram denominadas como *ScGST* (*Saccharum* GST), seguido da denominação referente a classe Phi (*ScGSTF*); Tau (*ScGSTU*); Theta (*ScGSTT*) e Zeta (*ScGSTZ*), numeradas de acordo com homologia aos ortólogos de arroz (Tabela 4).



Figura 1. Árvore filogenética das GSTs de arroz para classificação dos genes (TCs e *singletons*) das quatro classes de GST de cana-de-açúcar. Os alinhamentos das seqüências de aminoácidos foram realizados com o auxílio do programa ClustalW e a árvore foi construída utilizando as funções de máxima parcimônia no PAUP 4.0b10. Os valores de *bootstrap* baseado em 1000 repetições aparecem nos nós da árvore.



Figura 2. Árvore filogenética das GSTs de arroz para classificação dos genes (TCs) das quatro classes de GST de cana-de-açúcar. Os alinhamentos das seqüências de aminoácidos foram realizados com o auxílio do programa ClustalW e a árvore foi construída utilizando as funções de máxima parcimônia no PAUP 4.0b10. Os valores de *bootstrap* baseado em 1000 repetições aparecem nos nós da árvore.

As seqüências traduzidas dos 18 agrupamentos de ESTs de cana-de-açúcar e os respectivos genes de arroz foram alinhadas para confirmar a similaridade e identidade (Figura 3). A similaridade entre os genes de arroz e cana-de-açúcar variou entre 77 e 93% (média de 85%) e a identidade entre 65 e 85% (média 75%) [dados não mostrados]. A classificação das GSTs em plantas baseia-se na similaridade de seqüências de aminoácidos e na organização gênica das classes (DIXON et al., 1998; DROOG, 1997; MARRS, 1996). Entre as classes de GST (F, U, T e Z) de cana-de-açúcar, a identidade média entre as seqüências de aminoácidos foi de 12,5%, variando entre 8 e 17%, e 16% de similaridade média, variando entre 10 e 22%. Em arroz, a identidade entre as classes (F, U, T e Z) apresentou média de 14%, variando entre 7 e 21% (SORANZO et al., 2004). De acordo com Dixon, Lapthorn e Edwards (2002), a identidade das seqüências entre as classes é, via de regra, menor que 30% e dentro das classes, é maior que 30%.

Em arroz, a identidade média entre genes da classe Phi foi de 57,5% (variando entre 17 e 98%); e na classe Tau foi de 52,5% (variando entre 23 e 82%). Já em cana-de-açúcar, a identidade e similaridade média entre os 7 agrupamentos da classe Phi (*ScGSTF2, ScGSTF3, ScGSTF4, ScGSTF6, ScGSTF6, ScGSTF14* e *ScGSTF15*) foi 43,5% (variação entre 26 e 61%) e 58,5% (de 40 a 77%), respectivamente. Para os genes da classe Tau, identidade e similaridade média entre os 7 agrupamentos (*ScGSTU1, ScGSTU5, ScGSTU8, ScGSTU13, ScGSTU17, ScGSTU31 e ScGSTU39*) foi de 53% (entre 38 a 68%) e 66% (entre 51 e 81%), respectivamente. Entre os 3 agrupamentos da classe Zeta (*ScGSTZ1, ScGSTZ2* e *ScGSTF3*), a identidade variou entre 62 a 69%, com média de 65,5%, e a similaridade entre 72 e 81%, com média de 76,5%); respectivamente.

Os 18 agrupamentos de ESTs finais de cana-de-açúcar equivalem aos ortólogos mais expressos em arroz em termos de número de ESTs (Tabela 4; SORANZO et al., 2004). A classe Phi de cana-de-açúcar foi a mais numerosa quanto a número de ESTs individuais, seguidos da classe Tau, Zeta e Theta (Tabela 4). O gene mais expresso da classe Phi de cana-de-açúcar baseado em número de ESTs foi o *ScGSTF4*, representando 76 ESTs individuais (do total de 223); da classe Tau foi o gene *ScGSTU1* com 46 ESTs (do total de 103); da Theta foi o *ScGSTT1* com 2 ESTs sendo este o único representante da classe; e dentre os três genes encontrados na classe Zeta o *ScGSTZ3* foi o mais abundante com 18 ESTs do total de 27 (Tabela 4).

Em arroz, de acordo com Soranzo et al. (2004), a classe de GST que apresentou maior número de ESTs individuais foi a Tau; seguindo das classes Phi, Zeta e Theta. Os genes mais expressos nas classes Phi e Tau foram os *OsGSTF4* e *OsGSTU1*, representando 35 ESTs (do total de 75), e 45 ESTs (do total de 208), respectivamente. Na classe Theta o mais expresso foi *OsGSTT1* com 4 ESTs e na Zeta foi o *OsGSTZ1* representando 10 ESTs do total de 14. Os genes (*OsGSTF4, OsGSTU1* e *OsGSTT1*) considerados mais expressos na classe Phi, Tau e Theta de arroz foram os mesmos mais expressos de cana-de-açúcar (*ScGSTF4, ScGSTU1* e *ScGSTT1* baseado em dados de ESTs. Já o gene *OsGSTZ1* da classe Zeta de arroz foi o mais expresso, enquanto que em cana-de-açúcar foi *ScGSTZ3*. Tabela 4 - Agrupamentos de ESTs de cana-de-açúcar identificados em relação às seqüências dos genes ortólogos de GSTs de arroz, com suas respectivas localizações nos cromossomos de arroz, identificação do número de acesso (*Tentative consensus*), nomenclatura proposta a partir dos genes de arroz, número de ESTs individuais que compõe cada TC e o *e-value* relativo à similaridade com seqüências ortólogas de arroz.

Gene	Cromossomo	TC n ^o	Nomenclatura	N° de ESTs	a mala a
Arroz	Arroz	cana-de-açúcar	cana-de-açúcar	individuais	e-vaiue
OsGSTF2	1	TC24463	ScGSTF2	43	e ⁻⁸¹
OsGSTF3	3	TC34616	ScGSTF3	8	e ⁻⁹⁸
OsGSTF4	1	TC56926	ScGSTF4	76	e ⁻⁷⁵
OsGSTF5	1	TC41083	ScGSTF5	9	e ⁻⁶⁹
OsGSTF6	10	TC32542	ScGSTF6	18	e ⁻⁹³
OsGSTF14	3	TC32541	ScGSTF14	37	e ⁻¹⁰⁴
OsGSTF15	3	TC32758	ScGSTF15	32	e ⁻⁹⁹
			TOTAL	223	
OsGSTU1	3	TC32765	ScGSTU1	46	e ⁻⁶⁴
OsGSTU5	9	TC33535	ScGSTU5	22	e ⁻⁷²
OsGSTU8	10	TC36197	ScGSTU8	4	e ⁻⁸⁴
OsGSTU13	10	TC37214	ScGSTU13	2	e ⁻⁶³
OsGSTU17	9	TC42309	ScGSTU17	13	e ⁻⁹⁴
OsGSTU31	10	TC41753	ScGSTU31	14	e ⁻⁷⁰
OsGSTU39	1	TC46054	ScGSTU39	2	e ⁻³⁴
			TOTAL	103	
OsGSTT1	11	TC46876	ScGSTT1	2	e ⁻⁸⁶
			TOTAL	2	
OsGSTZ1	12	TC34572	ScGSTZ1	6	e ⁻⁹⁴
OsGSTZ2	12	TC45273	ScGSTZ2	3	e ⁻⁹³
OsGSTZ3	2	TC23951	ScGSTZ3	18	e ⁻⁸⁷
			TOTAL	27	

<i>OsGSTF2</i>	1 MAPMKLYGSTLSWNVTRCVAVLEEAGAEYEIVPLDFSKCEHKAPDHLARNPFGQVPALQD
<i>ScGSTF2</i>	1 MAPMKLYGATVSWNVTRCVVALEEAGAEYOIVPIDFATAEHKSPDHLVRNPFGQVPAFQD
consensus	1 MAPMKLYG TISWNVTRCV LEEAGAEY IVPIDF gEHK PDHL RNPFGQVPA QD
<i>OsGSTF2</i>	61 GDLFLWESRAICKYVCRKNKPELLKDGDLKESAMVDVWLEVESNQYTPALNPILFQCLIR
<i>ScGSTF2</i>	61 GDLHLWESRAICKYVARKNKPDLLREGNLKESAMVGVWLEVEANQYTAALNPILYQCLVS
consensus	61 GDL LWESRAICKYV RKNKPELLKdG LKESAMV VWLEVE NQYT ALNPILFQCLi
<i>OsGSTF2</i>	121 PMMFGAPPDEKVVEENLEKLKKVLEVYEARLTKCKYLAGDYISVADLSHVAGTVCLGATP
<i>ScGSTF2</i>	121 P <mark>MFGGTTDQKVVEENLEKLKKVLEVYEARL</mark> AKH <mark>KYLAGDFLSLADL</mark> NHVSVTLCLLATP
consensus	121 PmMFGa DKVVEENLEKLKKVLEVYEARLKKYLAGDyISVADLHV TvCLATP
OsGSTF2	181 HASVLDAYPHVKAWWTDLMARPSSQKVASLMKEPA-
ScGSTF2	180 HASVLDAYPHVKAWWDGLMARPSVQKVAALIKESSA
consensus	181 HASVLDAYPHVKAWW LMARPS QKVA LmKP a
<i>OsGSTF3</i>	1 MAAPVTVYGPMISPAVARVAACLLEKDVPFQVEPVDMSKGEHKSPSFLKLQPFGQVPAFK
<i>ScGSTF3</i>	1 MAAPVTVYGPVISPAVARVAACLLEKDVPFQIEPVDMSKGEHKSPSFLKLQPFGQVPAFK
consensus	1 MAAPVTVYGPMISPAVARVAACLLEKDVPFQvEPVDMSKGEHKSPSFLKLQPFGQVPAFK
<i>OsGSTF3</i>	61 DSLTTVFESRAICRYICDQYADSGNKTLMGRKEDGAVGRAAIBKWIEAEGQSFNPPSLAM
ScGSTF3	61 DHLTTVFESRAICRYICDQYADRGNQVLFGKKEGGAVGRATIBQWIESEGQSFNPPSLAI
consensus	61 D LTTVFESRAICRYICDQYAD GN L GrKE GAVGRA IE WIE EGQSFNPPSLAM
<i>OsGSTF3</i>	121 AFQLAFAPFMGRATDMAVVEQNEAKLVKVLDVYEQWLGENQYFAGDEFSLADLVHMPNTD
<i>ScGSTF3</i>	121 IFQLAFAPMMGRATDLAVVEQNEAKLAKVLDVYDQRLGESQYFAGDDFSLADLVHLPNAD
consensus	121 FQLAFAP MGRATDMAVVEQNEAKL KVLDVYEQ LGE QYFAGDEFSLADLVHmPN D
OsGSTF3	181 LLWRKTNKAGLFTERKNLAKWWDEVSARPSWKKVV <mark>ELQNVPRPS</mark>
ScGSTF3	181 F <mark>LVNRTNKAGLITERKNLARWWDDVSTRPAWKKV</mark> T
consensus	181 LV KTNKAGL TERKNLAKWWDEVS RP WKKV elqnvprps
<i>OsGSTF4</i>	1 MAG <mark>EGRKLRVYGM</mark> ALSANVVRVATVLNEKGLDFDLVPVDLRTAAHKQPHFLALNPFGQIP
<i>ScGSTF4</i>	1 MAPLKLYGMPVSP <mark>NVVRVATVLNEKGLDFEIIPVDL</mark> TTGAHKQPDFLALNPFAQIP
consensus	1 MA egrkLrvYGM 1S NVVRVATVLNEKGLDFdlvPVDL TAAHKQP FLALNPFgQIP
<i>OsGSTF4</i>	61 VLQDGDEVLYESRAINRYIATKYKAEGADLLPAEASPAKLEVWLEVESHHFYPAISGLVF
ScGSTF4	57 ALVDGDEVLYESRAINRYIATKFASS <mark>GA</mark> ALLPATP <mark>S-AKLEVWLEVESHHFYP</mark> NASPLVF
consensus	61 L DGDEVLYESRAINRYIATKY GA LLPA SpAKLEVWLEVESHHFYP S LVF
<i>OsGSTF4</i>	121 QLLIKPLLGGATDTAAVDEHAAALAQVLDVYDAHLAGSRYLAGNRFSLADANHMSYLLFL
ScGSTF4	116 QLLFRPLFGGAPDPVV <mark>VDKHAHELAKVLDVYEAHLA</mark> SNKYLAGDQFTLADANHASYLLYL
consensus	121 QLL kPL GGA D VD HA LA VLDVYDAHLA rYLAG FSLADANH SYLLFL
<i>OsGSTF4</i>	181 SKTEMAELVAFRPHVKAWWODISSRPAWKKTAAAIPFPPAA
<i>ScGSTF4</i>	176 TKTEK <mark>A</mark> GLVND <mark>RPHVKAWWO</mark> GIAA <mark>RPAFO</mark> KTAAAIPLPPPP <mark>SA</mark>
consensus	181 SKTP A LV RPHVKAWWD I RPAw KTAAAIP PP as
<i>OsGSTF5</i>	1MKVYGWVVSPNMARVLVALEEAGADYEVVPMSRSGGDHRRPEHLARNPFGEIPVL
<i>ScGSTF5</i>	1 MATSAVKVYGWAISPRVSRALLALEEAGVDYELVPMSRQDGDHRRPEHLARNPFGKVPVL
consensus	1 matsamKVYGW vSPwm R LVALEEAG eYEvVPMSR GDHRRPEHLARNPFG iPVL
OsGSTF5	56 EDGDLTLYQSRAIARYIFRKYKPEFLGLGEGG <mark>SLEESAMVDVWLDVEAHQ</mark> HEAAVRPILW
ScGSTF5	61 EDGDLTIFE <mark>SRAIAR</mark> HVLRKHKPELLGTGNLEQAALVDVWLDVEAHQLSPLAIAIVV
consensus	61 EDGDLTly SRAIAR i RK KPE LG Gegg LE AmVDVWLdVEAHQ II
<i>OsGSTF5</i>	116 HCIINK <mark>FEGRDRDQGVVDE</mark> SVRKLEKVLGVYEARLSG <mark>SRYLAGDRISLADLSHFSNMRYF</mark>
ScGSTF5	118 ECIFTPFLGRERNQAVVDENVEKLKKVLEVYEARLSQSKYLAGDFISLADLSHFIIMHCF
consensus	121 CI F GRdR QGVVDE V KL KVL VYEARLS SrYLAGD ISLADLSHFS Mr F
<i>OsGSTF5</i>	176 <mark>MATEYA</mark> GVVDAY <mark>PHVKAWWE</mark> ALLARPTV <u>QKVMAGMPPDFGFGSGNIP</u>
ScGSTF5	178 <mark>MATEYATLVEALPHVSAWWE</mark> SLAARP
consensus	181 MATEYA vVdA

(Continua)

<i>OsGSTF6</i>	1	AVKVF
ScGSTF6	1	MMKVLDHRKSHLKHSLKFFRKME ^S MSNAQHNAGCLLLLAKALAAADPPALPIEKM
consensus	1	mmkvldhrkshlkhslkffrkMP msnaqhnagcllllakalaaadppalpiekm VKVF
<i>OsGSTF6</i>	9	GSPSSAEVARVLACLFEKDVEFQLIRVDSFRG <mark>S</mark> KRMPQYLKLQPHGEALTFEDGNVTLVE
<i>ScGSTF6</i>	1	GSPTSAEVARVLACLFEKDVEFQLIRVDSFRGPKRLPQYLKLQPHGEALTFEDGNVTLVE
consensus	61	GSPSSAEVARVLACLFEKDVEFQLIRVDSFRG KRmPQYLKLQPHGEALTFEDGNVTLVE
<i>OsGSTF6</i>	69	SRKIIRHIADKYKNQGNPDLIG <mark>MGALER</mark> SSIEQWLQTEAQSFDVPSADVVYSLAYLPAAT
ScGSTF6	121	SRKILRHIAEKYKNQGYRDLFGPGALERASIEQWLQTEAQSFNIPSADMA <mark>YSLAYLP</mark> PDM
consensus	121	SRKIIRHIADKYKNQG DL G GALER SIEQWLQTEAQSF vPSADv YSLAYLP
<i>OsGSTF6</i>	129	TQPNKGAAAADGCBCBEEKNDDGCRDRQYSSQRQCCACAGGCBCDGQMAAAHRQKVEEMKQ
<i>ScGSTF6</i>	181	PLDGSRGGGCLGLPAAAGPGMNPTHRQKVEEMLQ
consensus	181	qpnkgaaa DG R eeeknd GG rqyssqr gAgAG GrdgqM HRQKvEEM Q
<i>OsGSTF6</i>	189	LFEKSSKELSKVLDIYEQRLE <mark>B</mark> AEYLAGDKFTLADLSHLPNADRL <mark>A</mark> ADPRTLRMLQSRRN
ScGSTF6	216	LFDKSRKELSKILDIYEQRLG <mark>B</mark> EAFLAGAKFTLADLSHLPNADRLTADPRSARLIQSRRN
consensus	241	LFEKS KELSKVLDIYEQRL E yLAG KFTLADLSHLPNADRL ADPRT RmlQSRRN
OsGSTF6	249	VSRWWADVSGRESWKQVKSLNRPPSAEAPF
ScGSTF6	276	VSRWWDTIS <mark>SRDSWTRVKELQRPPSAEAPF</mark>
consensus	301	VSRWW vS ReSW VK LnRPPSAEAPF
OsGSTF14	1	MAPASVKVFGSPTSAEVARVLMCLFEKDVEFQLVRVDAYRGTQRMPQYLKLQPLGEALTF
ScGSTF14	1	MASVKVFGSPTSAEVARVLMCLFEKEVEFQLIRVDAYRGTKRMPQYLKLQPHGEALTF
consensus	1	ma ASVKVFGSPTSAEVARVLMCLFEKdVEFQLvRVDAYRGT RMPQYLKLQP GEALTF
<i>OsGSTF14</i>	61	EDDNLTLSESRGILRHIAHKYARQGNPDLIGTGALERASIEQWLQTEAQSFDVPSAEMVY
<i>ScGSTF14</i>	59	EDDSLTLSDSRGILRHVS <mark>HKYAKQGNPDLIGTGALERASIEQWLQTEAQSFDSPSAEMVY</mark>
consensus	61	EDD LTLSESRGILRHI HKYArQGNPDLIGTGALERASIEQWLQTEAQSFD PSAEMVY
OsGSTF14	121	SLAFLPPNMPKONDNGNGNGNGYGNSNGRÞVQVANASSKRVVAGATDGKTAASGANGNKQ
ScGSTF14	119	SLAILPPTLPROCNDNNGTGTGSG-FNARDVAVGSNADASSGKRGVAGSQQPAASOSOVS
consensus	121	SLA LPP mPkQn NG G G nn NgRev Va a G g n n
<i>OsGSTF14</i>	181	QQKEEEMRKVFEKSKKDLEKLLDIYEQRLEEAAYLAGDKFTIADLSHLPNADRLASDPRS
<i>ScGSTF14</i>	178	PQKEEEMLKLFEQRKKDLEKLLDIYEQRLEEAKYLAGDNFTIADLSHLPNADRLVSDPRS
consensus	181	QKEEEM KVFE KKDLEKLLDIYEQRLEEA YLAGD FTIADLSHLPNADRL SDPRS
<i>OsGSTF14</i>	241	RRMFEARKNVSRWMNNISSRESWE <mark>YVKSLQRPPS</mark> A
<i>ScGSTF14</i>	238	RRMFES <mark>RKNVSRWM</mark> HDVSSRDTW <mark>QYVKSLQRPPST</mark> STDASAKNGQQQQHLPGSTDGHGVK
consensus	241	RRMFE RKNVSRWW iSSResW YVKSLQRPPS stdasakngqqqqhlpgstdghgvk
<i>OsGSTF14</i> <i>ScGSTF14</i> consensus	298 301	SHQQVQNERHF shqqvqnerhf
OsGSTF15	1	MAAGLQVFGQPASTDVARVLTCLFEKNLEFELIR <mark>I</mark> DTFKKEHKLPEFIKLRDPTGQVTFK
ScGSTF15	1	MAAGLQVFGQPASTDVARVLTCLFEKNLEFELVR <mark>T</mark> DTFKKSHKLPEFIKLRDPTGQVTFK
consensus	1	MAAGLQVFGQPASTDVARVLTCLFEKNLEFELIR DTFKK HKLPEFIKLRDPTGQVTFK
<i>OsGSTF15</i>	61	HGDKTLVDSRAICRYLSTQFPDDG <mark>NRTIYGT</mark> GSLERASIEQWLQAEAQSFDAPSSELVFH
<i>ScGSTF15</i>	61	HGDKTIVDSRAICRYLCTQFPDDGYKKLYGMGSLERASIEQWLQAEAQSFDAPSSELVFH
consensus	61	HGDKTIVDSRAICRYL TQFPDDG r iYG GSLERASIEQWLQAEAQSFDAPSSELVFH
OsGSTF15	121	LAFAPQLN-IPADEARIAENERKLQOMLNVYDEIIAKNKYLAGDEFTLADLSHLPNSHYI
ScGSTF15	121	LAFAPHLKDVRPDEARVAENEKKIHNMLGVYDDIIS <mark>KNEYLAGDDFTLADLSHLPNSHYI</mark>
consensus	121	LAFAPL di DEARIAENErKL qMLVYDEIL KNYLAGDEFTLADLSHLPNSHYI
<i>OsGSTF15</i>	180	VNARSPRGKKLFTSKKHVARWYEE <mark>ISNRASWKQVVKMQSEHPGAFE</mark>
ScGSTF15	181	VNS-SDRGRKLFTARKHVARWYDKISTRDSWRQVIKMQREHPGTFE
consensus	181	VN rS RGKKLFT KKHVARWYE IS R SWKQVVKMQ EHPG FE

61

(Continuação)

<i>OsGSTU1</i>	1 MAEEKELVLLDFWVSPFGQRCRIAMAEKGLEFEYREEDLCNKSDLLLRSNPVHRKIPV
ScGSTU1	1 MAGEKKQGLQLLDFWVSPFGQRCRIALDEKGLPYEYLEQDLANKSSLLLRANPVHKKIPV
consensus	1 MA EK qgL LLDFWVSPFGQRCRIAm EKGL FEY E DLgNKSdLLLR NPVHrKIPV
<i>OsGSTU1</i>	59 LLHAGRPVSESLVILQYLDDAFPGTPHLLEPGNSGDADAAFARATAREWADYVDRKLYDC
ScGSTU1	61 LLHDGRPVCESLIIVQYLDEAFPATPALLEAGDPYARAQAREWADYVDKKLYDC
consensus	61 LLH GRPV ESLVIIQYLDdAFPgTP LLP G gdadaafARA ARFWADYVDrKLYDC
<i>OsGSTU1</i>	119 <mark>GSRLWRLKGPPHAAAGREMAEILRTLEAELGDRE</mark> FFGGGGGGRLGFVDVALVPFTACSTA
ScGSTU1	115 <mark>GTRLWKLKGDGHAQA</mark> RT <mark>EMIEILRTLEGALGEGRFFGG</mark> EAF <mark>GFVDVALVPFT</mark> SWFLA
consensus	121 GSRLWRLKGE HA A EM EILRTLEA LGd FFGgggG GFVDVALVPFT A
<i>OsGSTU1</i>	179 TERCEGFSVEEVAPRLAAWARRGRIDSVVKHLPSPEKVYDFVGVLKKKYGVE
ScGSTU1	172 Y <mark>ERFG</mark> DL <mark>SVE</mark> KEC <mark>PRLAAWAKRCAERPSVAKNL</mark> YPADKVYEFICGLKKRLGIE
consensus	181 ER G SVE PRLAAWARR g SV K L eKVYdFv LKKk GvE
<i>OsGSTU5</i>	1MAD <mark>EVVLLDLWVSPFGQRCRIALAEKGVEYEY</mark> S <mark>EQ</mark> SLADKSDLLLRSNPVHKKVPVL
<i>ScGSTU5</i>	1 MAAAEPEVVLLDFWVSPFGQRCRIALAEKGVAYEYREQDLRSKGFLLLRSNPVHKKIPVL
consensus	1 maa EVVLLD WVSPFGQRCRIALAEKGV YEY EQ L K dLLLRSNPVHKKvPVL
<i>OsGSTU5</i>	58 LHAGRPVCESLVILEYIDETWPPEPEKKKESPRILPSDPYARARARFWADYVDKKLFDCQ
ScGSTU5	61 LHAGRPVCESLVILQYIDEVWPDVABLLPKDDPHARAQARFWADYIDKKIYDSQ
consensus	61 LHAGRPVCESLVIL YIDE WPpepekk P L DP ARA ARFWADYVDKKIFD Q
<i>OsGSTU5</i>	118 TRLWKLRAGDAAHEQAKRDMAEALGTLEAELGEGDYFGGEAFGYIDVVLVPFVAWFHAYE
ScGSTU5	115 TRLWKLKGEAREQAKKDMIEVLKTLEGELADKPFFGGDAFGFVDVALVPFTCWFLTYE
consensus	121 TRLWKLragd AhEQAKrDM E L TLEAELge yFGGeAFGylDV LVPF WF YE
<i>OsGSTU5</i>	178 RLAGEAVAEICPRIVAWGERCKGRDSVAKTLTDPEKVYEFALYLKAKFGAK
ScGSTU5	173 KLGE <mark>BSVEEHCPKIVAWAERCKERESVAKALSDPDKVFEFVQFL</mark> QS <mark>KFGAK</mark>
consensus	181 rLa F V E CPrlVAWgERCK RdSVAK LtDPeKVyEF yL KFGAK
<i>OsGSTU8</i>	1 MAGAGR <mark>DELKLLGMWASPYVSRAKLALQLKGVSYEYIEEDLGNKSDLFLR</mark> SNPVHKTVPV
ScGSTU8	1 MARD <mark>G-GELKLLGMWASPFVTRAKLALQIKGLSYEYVEEDLGNKSELLL</mark> SSNPVHK
consensus	1 MA Gr ELKLLGMWASPyVsRAKLALQIKGvSYEYIEEDLGNKSdL L SNPVHK VPV
<i>OsGSTU8</i>	61 LIHNGNPICESSIIVQYIDESEPSSAASLLPADPYDRAVARFWAAYIDDKLAAPWRMVYR
ScGSTU8	60 <mark>LIHNGKPVCESSVIVQYIDDTEAGSGPSLLPADPYORAVARFWAAYLEDKILTPWRRVEM</mark>
consensus	61 LIHNG PICESSIIVQYIDESF Sa SLLPADPY RAVARFWAAYIDDKI PWR VY
<i>OsGSTU8</i>	121 VKTEEERDELMKQTLAAVDVLEGGLKECSK <mark>G</mark> KGCFFGGDSVGYVDVVLGGLVSWVHASDK
ScGSTU8	120 VKTDEEKAEAMRQTLAAVAALEDGLNECSGGO <mark>GPFFGGASVGYLDVLLGGNVSWVKAS</mark> EQ
consensus	121 VKTEEER E MKQTLAAV LE GL ECS G G FFGG SVGYvDVvLGGLVSWVHASd
<i>OsGSTU8</i>	181 LSGAKLFDAAKAPLLAAWLGREGELDAAKAVLQDVDKVVEYAKKFOPRDSCTAADRQAVN
ScGSTU8	180 LSGAKIIDAAKTPLLAAWMEHECELDAAKAVLQDVDAVVEYARTVQARVAAATANSQ
consensus	181 LSGAKI DAAK PLLAAWI rF ELDAAKAVLQDVD VVEYAK Q R g A Qavn
<i>OsGSTU13</i>	1 MAGKODDVKVLGVVVSPFALRVRIALNIKGVSYEYVEEDIFNKSELLL <mark>T</mark> SNPVHKKVPVL
<i>ScGSTU13</i>	1 <mark>MAGKED-IKILGLPLSPEV</mark> VS <mark>VRMALNMKGVSYEYVDEDIN<mark>NKSELLLK</mark>SNPVHKKVPVL</mark>
consensus	1 MAGKdDdvKvLGv vSPF i VRIALNIKGVSYEYVEEDI NKSELLL SNPVHKKVPVL
<i>OsGSTU13</i>	61 IHGGKPISESLVIVQYVDEVWAAAPSVLFADPYDRAVARFWAAYVDNNMFFGMAGVLFAA
ScGSTU13	60 IHNGKPICESLVILQYVDELFAGR-SILFTDPYERATARFWAAFAGDKIFPAWYGVVTAQ
consensus	61 IH GKPI ESLVIVQYVDEVWAA pSvLP DPYdRA ARFWAAy mFPg GVl A
<i>OsGSTU13</i>	121 TEEERAAKAEETLAALAQIEKAFAECAGGKAFFGGDSIGYVDLALGSNIHWFEALRRIFG
<i>ScGSTU13</i>	119 AEEERAEKVKETLAALEHYEVAFAKCSGGNAFFGGDSIGYVDVVLGSFIFWFEAVRRVDG
consensus	121 EEERA K ETLAAL 1E AFA C GG AFFGGDSIGYVDLLGS LWFEALRRLG
<i>OsGSTU13</i>	181 VALIDAG <mark>KTPLLAAWAKRE</mark> VEAE <mark>AAK</mark> GVVPDAGVAVELGKKLQARAAAASTAA
ScGSTU13	179 LEIINAS <mark>KTPLLAAWAERE</mark> GGSVX <mark>AKEAVPVT</mark> KADIAVQYINKFRAPAAAAAAKLASSE
consensus	181 v 11 A KTPLLAAWA RF AAK VPvt A vAV K A AAAA A lasse

(Continuação)

OsGSTU17	1 MAADKGVKVFGMWASPMAIRVEWALRLKGVDYEYVDEDLANKS <mark>EALLRH</mark> NPVTKKVPVLV
SCGSTU17 consensus	1 -MADKGVKVEGMWASPMVLKVEWALKLKGVDYEYVDEDLANKSADLLKINEVTKKVEVLV 1 m AdKGVKVFGMWASPM IRVEWALKLKGVdYEYVDEDLANKS LLR NEVTKKVEVLV
OSGSTU17 ScGSTU17	61 HDGKPLAESTVIVEYIDEAWKHGYPIMPSDPFDRAQARFWARFAEEKCNAALYPIFMTTG 60 HDGKPIAESTIIVEYIDEVWKGGYPIMPADPYERAOARFWARFAEEKCNAALYPIFTATG
consensus	61 HDGKPLAESTvIVEYIDE WK GYPIMP DPfdRAQARFWARFAEEKCNAALYPIF TG
OsGSTU17	121 EEQRKLVHEAQQCLKTLETALEGKKFFGGDAFGYLDIVTGWFAYWLPVLEEACGVEVVTD
ScGSTU17	120 BAQRKAVQEAQQCLKTLETALDGKKFFGGDAVGYLDIVVGWYAHWLPVVEEVIGASVVTD
consensus	121 E QRK V EAQQCLKTLETALEGKKFFGGDA GILDIV GWIA WLPVIEE G VVTD
OsGSTU17	181 EALPLMKAWFDRVLAVDAVKAVLPRDKLVALNKARREQILSA
consensus	180 MELEPUNAWUR HAVDVVAABUUNIN HANNANNY ISA 181 E LPLMKAWFDR LAVD VKA LP RDKLvA NKARREQILSA
OsGSTU31 ScGSTU31	1 MSSTNSSCDPAAVRVVGGWASPFMNRVVVALKLKGVEHBMLQDTVGKKSELLLRSNPVHK 1 MSBAFAVRVTCLMPSPFMTRVLTALKLKGVKYBFVEEVVGKKSELLLRSNPVHK
consensus	1 MSstnssgd AVRVvG W SPFm RVvvALKLKGV E 1 E VGKKSELLLRSNPVHK
OsGSTU31	61 KIPVLLHHGKPIAESLIIYIDEVWPASNGAPSILPRDPYGRAVERFWAKYIDDKIPPG
ScGSTU31	55 KIPVLLHHGKPISESLIIVQYIDEVMSSDAPAFLPADPYTRAVHRFWAQYVDDKVPSA
consensus	61 KIPVLLHHGKPI ESLIIVqIIDEVWPAS AP LP DPI KAV KFWA IIDDKIP G
OsGSTU31	119 IRVLRGSVEEDKDKAAGEMSTALCHLEEAFVKCSQGKQYFGGDNIGYLDIALGSFLGWIR
consensus	113 IRTERGEDDEGREEAAGOISAALQIEEAAARDOGRAALSOGRAALGGESVGILDIAHVSIVGWVA 121 IRvLRGs eE KD AAG mS ALQ LEEAF K SQGK YFGGD iGYLDIAL SflGWir
0eCSTT131	
ScGSTU31	173 AVEKTAGU <mark>DIDNETKVINIGAUGUKTGA</mark> HTAVVDVUDALPDADKFVEFSVTYGSFSKPIINGP
consensus	181 AVEKiAGV LL KVPNL AWADR C HPAVVD vPDADkfvefsvtygsfskpiingp
OsGSTU39	1 MAGRGGGGELRLLGTWSSPWVIRVRVALGMKGLSYEYTEEDLSSKSDHLLRSNPVHEKVP
ScGSTU39	1
consensus	1 magrggggelrllgtwsspwvirvrvalgmkglsyeyteedlssksdhllrsnpvhekvp
OsGSTU39	61 VLIHGGRPVCESLVVLEYIDETWGATGTPQLLPADPYDRATARFWTNYVNDTFFPSWKVL
SCGSTU39 consensus	1LCESLVLLQYVDEAWPATTGPPLLPADPYDRATARFWAAYVNDNELPAFRAL 61 vlihggrpvCESLVvL yide w at pilpadpydratarfw yvnd f p wk L
OSGSTU39 ScGSTU39	53 FRSLTDEQRAEAFKNVVPRVEALERAFGECSKGKAFFGGDDAGLVDVALGSHLVWIKVVD 53 FRSLTDEQRAEALQNAVPAVETLERAFAECSKGKAFFGGDAVGIVDIALGSHLVWIRVVD
consensus	121 FRS EQRAEA N VP VE LERAFGECSKGKAFFGGD G1VDvALGSHLVWIKVVD
OsGSTU39	
	181 EVAG <mark>A</mark> NLLDEAKFPGLAAWAERFLAVDAVR <u>Q</u> VMPDAGDVLK <u>Q</u> YKGFLAKWTAGAGSS
ScGSTU39	181 EVAGANLLDEAKFPGLAAWAERFLAVDAVRQVMPDAGDVLKQYKGFLAKWTAGAGSS 113 EVGGTNFLDGAKFPGLAAWAERFVAVDAVKKVMPDAGKVLEG
<i>ScGSTU39</i> consensus	181 EVAGANLLDEAKFPGLAAWAERFLAVDAVRQVMPDAGDVLKQYKGFLAKWTAGAGSS 113 EVGGTNFLDGAKFPGLAAWAERFVAVDAVKKVMPDAGKVLEQ 181 EVaG N LD AKFPGLAAWAERFLAVDAVr VMPDAG VL Qykgflakwtagagss
ScGSTU39 consensus	181 EVAGANILDEAKFPGLAAWAERFLAVDAVRQVMPDAGDVLKOYKGFLAKWTAGAGSS 113 EVCGTNFLDGAKFPGLAAWAERFVAVDAVKKVMPDAGKVLEG 181 EVag N LD AKFPGLAAWAERFLAVDAVr VMPDAG VL Qykgflakwtagagss
ScGSTU39 consensus OsGSTT1	181 EVAGANLLDEAKFPGLAAWAERFLAVDAVRQVMPDAGDVLKQYKGFLAKWTAGAGSS 113 EVGGTNFLDGAKFPGLAAWAERFVAVDAVKKVMPDAGKVLEG 181 EVaG N LD AKFPGLAAWAERF1AVDAVr VMPDAG VL Qykgflakwtagagss 1 MQPLLKVYADRRSQFSRATIIFCRVNRIDFEEVTVDLFKREHLSPEFKKINPMCQVPAIV
ScGSTU39 consensus OsGSTT1 ScGSTT1 consensus	 181 EVAGANLLDEAKFPGLAAWAERFLAVDAVRQVMPDAGDVLKOYKGFLAKWTAGAGSS 113 EVCCTNFLDGAKFPGLAAWAERFVAVDAVKKVMPDAGKVLEG 181 EVAG N LD AKFPGLAAWAERF1AVDAVr VMPDAG VL Qykgflakwtagagss 1 MQPLLKVYADRRSQFSRATIIFCRVNRIDFEEVTVDLFKREHLSPEFKKINPMCQVPAIV 1 MSP-IKVYAHRWSQFCRAVIIFCRVNKIDFEEVTVDLFKSQNLTPEFKKINPMCQVPAIV 1 M PLLKVYA R SQP RAIIIFCRVNRIDFEEVTVDLFK LSPEFKKINPMCQVPAIV
ScGSTU39 consensus OsGSTT1 ScGSTT1 consensus	181 EVAGANLLDEAKFPGLAAWAERFLAVDAVRQVMPDAGDVLKQYKGFLAKWTAGAGSS 113 EVCGTNFLDGAKFPGLAAWAERFVAVDAVKKVMPDAGKVLEG
ScGSTU39 consensus OsGSTT1 ScGSTT1 consensus OsGSTT1 ScGSTT1	 181 EVAGANLLDEAKFPGLAAWAERFLAVDAVRQVMPDAGDVLKQYKGFLAKWTAGAGSS 113 EVGCTNFLDGAKFPGLAAWAERFLAVDAVKKVMPDAGKVLEQ 181 EVaG N LD AKFPGLAAWAERFLAVDAVr VMPDAG VL Qykgflakwtagagss 1 MQPLLKVYADRRSQFSRATIIFCRVNRIDFEEVTVDLFKREHLSPEFKKINPMGQVPAIV 1 MSP-IKVYAHRWSQFCRAVIIFCRVNKIDFEEVTVDLFKSQNLTPEFKKINPMGQVPAIV 1 M PILKVYA R SQP RAIIIFCRVNRIDFEEVTVDLFK LSPEFKKINPMGQVPAIV 1 M PILKVYA R SQP RAIIIFCRVNRIDFEEVTVDLFK LSPEFKKINPMGQVPAIV 1 DGRFRLFESHAILRYLATVFPGVADHWYPADLFTRAKLBALDWHHSNLRRGAATFILNT 60 DGRFKLFESHAILRYLASVFPGVPHVWPADLCIRAKLBSILDWHHSNLRLGAATFYL
ScGSTU39 consensus OsGSTT1 ScGSTT1 consensus OsGSTT1 ScGSTT1 consensus	 181 EVAGANLLDEAKFPGLAAWAERFLAVDAVRQVMPDAGDVLKOYKGFLAKWTAGAGSS 131 EVAGANLLDEAKFPGLAAWAERFVAVDAVKKVMPDAGKVLEG
ScGSTU39 consensus OSGSTT1 ScGSTT1 consensus OSGSTT1 consensus OSGSTT1	 181 EVAGANLLDEAKFPGLAAWAERFLAVDAVRQVMPDAGDVLKOYKGFLAKWTAGAGSS 13 EVGCTNFLDGAKFPGLAAWAERFVAVDAVKKVMPDAGKVLEG
ScGSTU39 consensus OsGSTT1 ScGSTT1 consensus OsGSTT1 consensus OsGSTT1 ScGSTT1 ScGSTT1	 181 EVAGANLLDEAKFPGLAAWAERFLAVDAVRQVMPDAGDVLKOYKGFLAKWTAGAGSS 113 EVGCTNFLDGAKFPGLAAWAERFLAVDAVKKVMPDAGKVLEG 181 EVAG N LD AKFPGLAAWAERFLAVDAVR VMPDAG VL Qykgflakwtagagss 1 MQPLLKVYADRRSQFSRATIIFCRVNRIDFEEVTVDLFKREHLSPEFKKINPMGQVPAIV 1 MSP-IKVYAHRWSQFCRAVIIFCRVNRIDFEEVTVDLFKSQNLTPEFKKINPMGQVPAIV 1 M P11KVYA R SQP RAIIIFCRVNRIDFEEVTVDLFK LSPEFKKINPMGQVPAIV 1 M P11KVYA R SQP RAIIIFCRVNRIDFEEVTVDLFK LSPEFKKINPMGQVPAIV 1 DGRFRLFESHAILRYLATVFPGVADHWYPADLFTRAKLEAILDWHHSNLRGAATFILNT 60 DGRFKLFESHAILRYLAVFPGV DHWYPADL RAKIE SLLDWHHSNLRGAATFI T 121 VLAPSLGLPSSFCAAKEAEKVLFRSLCLIESMWLKGNAKFLLGNPQLSIADLSLVCEIMQ 122 ALAPFLGLKPREFATKHAEKVLMQSLARIESEWLKGDAKVLLGSPQPSIADLSLVCEIMQ
ScGSTU39 consensus OsGSTT1 ScGSTT1 consensus OsGSTT1 ScGSTT1 consensus OsGSTT1 ScGSTT1 consensus	181 EVAGANLLDEAKFPGLAAWAERFLAVDAVRQVMPDAGDVLKOYKGFLAKWTAGAGSS 113 EVCCTNFLDGAKFPGLAAWAERFLAVDAVKKVMPDAGKULEG
ScGSTU39 consensus OsGSTT1 ScGSTT1 consensus OsGSTT1 ScGSTT1 consensus OsGSTT1 ScGSTT1 consensus OsGSTT1 ScGSTT1	<pre>181 EVAGANLLDEAKFPGLAAWAERF AVDAVRQVMPDAGDVLKOYKGFLAKWTAGAGSS 113 EVGCTNFLDGAKFPGLAAWAERF VAVDAVKKVMPDAGKVLEG</pre>

(Continuação)

(Conclusão)



Figura 3. Alinhamentos gerados no programa ClustalW, das 18 seqüências traduzidas relativa aos genes de GST de arroz e os agrupamentos de ESTs de cana-de-açúcar. A identidade dos aminoácidos das seqüências alinhadas representada em preto, similaridade em cinza e a diferença em branco (Programa Boxshade, http://www.isrec.isb-sib.ch/software/).

Para complementar os alinhamentos gerados acima, foi realizado uma outra análise de alinhamento utilizando um representante de cada classe de GST (ScGSTF4, ScGSTU1, ScGSTT1 e ScGSTZ3) de cana-de-açúcar, sendo os genes selecionados considerados os mais representativos em número de ESTs individuais. Foi observada uma considerável diversidade entre as seqüências dos genes referentes às classes de GST, sendo a região terminal amino dos genes a mais conservada (Figura 4). Isto é verdadeiro quando se trata do domínio N-terminal da proteína, qual apresenta uma seqüência mais conservada de aminoácidos por se tratar de uma região que contém o sítio G, ou sítio de ligação do tripeptídeo glutationa (MARRS, 1996). A região do domínio C-terminal da GST que contém o sítio H, ou sítio de ligação do substrato eletrofílico hidrofóbico; é mais flexível que a observada no domínio N-terminal (sítio G). Particularmente na região terminal carboxi, ligam-se diferentes substratos, como os xenobióticos (p.e. herbicidas) ou compostos tóxicos endógenos (p.e. precursor da antocianina) (NEUEFEIND et al., 1997a, 1997b; REINEMER et al., 1996). Na maioria das GSTs de animais, a função de ligante específico do tripeptídeo glutationa é carreada por um resíduo Tyr (tirosina), e em plantas esta função é de um resíduo Ser (serina) [BOARD et al., 1997].

A presença de três resíduos de aminoácidos altamente conservados nas seqüências das GSTs de cana-de-açúcar foi observada. O resíduo Ser (posição 12 do *ScGSTF4*) foi conservado em todos genes, com exceção do *ScGSTZ2*. O resíduo Ser localizado no domínio ligante da glutationa é conhecido por ser considerado fundamental para a atividade da GST. A Arg (arginina) na posição 17 do mesmo gene foi também conservada nos genes, com exceção dos *ScGSTU13* e *ScGSTT1* onde é substituído por uma Ser e Ala, respectivamente. Finalmente o resíduo Ser (posição 68 do *ScGSTF4*), único dos três aminoácidos que se conservou em todas as seqüências dos genes de GST (Figura 4). Os três resíduos de aminoácidos altamente conservados (Ser, Arg e Ser) já haviam sido identificados em milho, soja, arroz e *Arabidopsis* (McGONIGLE



et al., 2000; SORANZO et al., 2004; WAGNER et al., 2002).

Figura 4. Alinhamento gerado no programa ClustalW de um representante de cada classe de GST (ScGSTF4, ScGSTU1, ScGSTT1 e ScGSTZ3) de cana-de-açúcar. A seta vertical indica a posição dos três resíduos de aminoácidos (S - Ser, R - Arg e S - Ser) conservados nos genes. Aminoácidos idênticos indicado por preto e os similares por quadrado cinza (Programa Boxshade, http://www.isrec.isb-sib.ch/software/).

As GSTs das classes Theta e Zeta são pobremente representadas em cada organismo, indicando que estes genes sofreram poucas duplicações ou que as cópias duplicadas foram posteriormente perdidas (BOARD et al., 1997). Em contraste, as GST Phi e Tau (planta-específicas) têm sofrido grandes duplicações e divergências, estas por sua vez divergiram precocemente e depois expandiram independentemente (DIXON et al., 2002a; McGONIGLE et al., 2000).

As estatísticas de re-amostragem indicando a robustez da topologia e agrupamentos das árvores consensuais, e os altos valores de similaridade e identidade entre as seqüências obtidas nos alinhamentos, permitiram categorizar as seqüências investigadas nas quatro classes de GST (*F*, *U*, *T* e *Z*) de cana-de-açúcar (Tabela 4). Portanto, os 18 agrupamentos de GST de cana-deaçúcar que foram denominados como *ScGSTF2*, *ScGSTF3*, *ScGSTF4*, *ScGSTF5*, *ScGSTF6*, *ScGSTF14* e *ScGSTF15* (genes da classe Phi); *ScGSTU1*, *ScGSTU5*, *ScGSTU8*, *ScGSTU13*, *ScGSTU17*, *ScGSTU31* e *ScGSTU39* (genes da classe Tau); *ScGSTT1* (gene da classe Theta); e *ScGSTZ1*, *ScGSTZ2* e *ScGSTZ3* (genes da classe Zeta).

5.2 Desenvolvimento de iniciadores gene-específico para GST

Após a identificação dos 18 genes de GST de cana-de-açúcar, foram desenhados iniciadores específicos (Tabela 1), direcionados para a região 3'-UTR, que apresenta uma diversidade maior na seqüência de nucleotídeos, para permitir a melhor discriminação entre os diversos genes de cada classe de GST. Seguida a construção de iniciadores, foi realizada a extração de RNA total das amostras do primeiro e segundo ensaio, que foram então analisadas por eletroforese em gel de agarose (Figura 5 e 6), respectivamente e quantificado em espectrofotômetro. Depois de confirmada a integridade do RNA total, as amostras foram submetidas à síntese de cDNA por PCR.



Figura 5. RNA total de cana-de-açúcar obtido via Trizol (Invitrogen). Tecidos: limbo foliar 'SP80-3280' (L); parênquima do colmo do cruzamento da 'SP80-180' com a 'SP80-4966' (C); inflorescência da 'SP80-3280' (I); meristema da 'SP87-432' (M); e raiz da 'SP80-3280' (R).



Figura 6. RNA total do tecido foliar das cultivares 'SP87-365' (A) e 'SP80-3280' (B) de cana-de-açúcar obtido via Trizol (Invitrogen) nos tempos de 0 e 48 h após a aplicação dos diferentes herbicidas. Tratamentos: Controle (C), Ametryn (Am); Diuron (Di); Imazapic (Im); e Isoxaflutole (Is).

Para validar a amplificação e confirmar a identidade dos produtos de amplificação (*amplicom*) dos iniciadores dos genes de GST propostos foi realizada uma amplificação com os 18 iniciadores específicos empregando o *pool* de cDNA (cultivares sem herbicida – 0 h) como DNA molde, visando à clonagem, transformação e o seqüenciamento. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose, cada fragmento obtido foi excisado do gel, clonados e transformados (dados não mostrados).

Em seguida, foi realizada a extração de DNA plasmidial dos respectivos clones, e para confirmar que os produtos amplificados foram clonados, uma reação de amplificação foi realizada com os iniciadores específicos dos genes. Depois da amplificação, o DNA plasmidial extraído dos produtos amplificados possivelmente clonados foram submetidos ao sequenciamento para confirmação final. Após as análises individuais das seqüências no GenBank (nr) e no *BlastN* e *BlastX* pelo *Saccharum Gene Index*, foi observado que dos 18 produtos de amplificação, 17 tiveram sua identidade confirmada. Apenas o gene *ScGSTZ2* não foi clonado, possivelmente devido a baixa quantidade de transcritos obtidos na amplificação, dificultando a sua purificação do gel e clonagem. Portanto, foi demonstrada a identidade dos produtos de amplificação derivada dos iniciadores para os genes de GST de cana-de-açúcar. As 17 seqüências dos

produtos amplificados clonados referentes às classes de GST de cana-de-açúcar estão listadas no Apêndice A.

Para confirmar a especificidade de cada par de iniciadores, foram utilizados como molde de amplificação os clones de EST, específicos de cada gene de GST de cana-de-açúcar identificado (Tabela 2). Esses clones adquiridos do BCCCC ao serem recebidos foram seqüenciados para confirmação de identidade (dados não mostrados). O experimento de avaliação de especificidade dos iniciadores consistiu em testar os clones com todos os iniciadores, sendo o próprio clone o controle positivo. Todos os iniciadores dos diversos genes das classes de GST amplificaram seus respectivos clones de EST (controle positivo) [diagonal da Tabela 5].

Os iniciadores para os genes *ScGSTF2*, *ScGSTF3*, *ScGSTF5*, *ScGSTF6*, *ScGSTU8*, *ScGSTU13*, *ScGSTU17*, *ScGSTU31*, *ScGSTU39*, *ScGSTT1* e *ScGSTZ1* foram considerados específicos, amplificando apenas seus respectivos clones de EST (*F2*, *F3*, *F5*, *F6*, *U8*, *U13*, *U17*, *U31*, *U39*, *T1* e *Z1*; Tabela 5). Já os iniciadores da classe Phi (*ScGSTF4*, *ScGSTF14* e *ScGSTF15*) amplificaram além de seus respectivos clones (*F4*, *F14* e *F15*) e um outro clone da mesma classe, mas produzindo bandas com menor intensidade. O mesmo ocorreu para os genes *ScGSTU1* e *ScGSTU5*, e *ScGSTZ2* e *ScGSTZ3* referente às classes Tau e Zeta, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Os resultados da amplificação dos iniciadores específicos dos genes de GST com os clones de EST de cana-de-açúcar. A diagonal (em negrito) indica amplificação específica (+) do iniciador com o seu respectivo clone (controle positivo). (+) amplificação e (-) não amplificação dos iniciadores em relação aos demais clones.

Clones Iniciador específico	F2	F3	F4	F5	F6	F14	F15	U1	U5	U8	U13	U17	U31	U39	T1	Z1	Z2	Z3
ScGSTF2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScGSTF3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScGSTF4	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScGSTF5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScGSTF6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScGSTF14	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScGSTF15	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScGSTU1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ScGSTU5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ScGSTU8	-	_	-	-	-	_	_	-	-	+	-	-	-	-	-	-	_	_
ScGSTU13	-	_	-	-	-	_	_	-	-	-	+	-	-	-	-	-	_	_
ScGSTU17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ScGSTU31	-	_	-	-	-	_	_	-	-	-	-	-	+	-	-	-	_	_
ScGSTU39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ScGSTT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ScGSTZ1	-	-	-	-	-	_	-	-	-	_	-	_	-	_	-	+	-	-
ScGSTZ2	-	-	-	-	-	-	-	_	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ScGSTZ3	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	+	+

Um exemplo da especificidade dos iniciadores pode ser conferido na Figura 7, onde foi utilizado um par de iniciador representante de cada classe (*ScGSTF4*, *ScGSTU1*, *ScGSTT1* e *ScSGTZ3*) para amplificar os clones (*F4*, *U1*, *T1* e *Z3*). Portanto, a grande maioria das amplificações com os iniciadores para os genes pode ser considerada gene-específica (somente amplificação do respectivo clone), ou no mínimo classe-específica (amplificação de alguns clones pertencentes à mesma classe).



Figura 7. Análise da especificidade dos iniciadores dos genes de GST de cana-de-açúcar com os clones de ESTs. (M). marcador de peso molecular 100 pb, (1). clone F4, (2) clone U1, (3) clone T1, (4) clone Z1 e (b) água ultrapura estéril.

Em seguida, os iniciadores foram testados para amplificação de DNA genômico para avaliar a presença de íntron na região amplificada. Foram analisados como molde amostras do *pool* de cDNA (primeiro e segundo ensaio) e DNA genômico de 'SP80-3280'. Os sete pares de iniciadores para os genes da classe Phi (*ScGSTF*) amplificaram cDNAs e DNA genômico (Figura 8). Não foi observada a presença de íntrons nos produtos de amplificação dos genes de GST da classe Phi. Utilizando os sete pares de iniciadores dos genes da classe Tau (*ScGSTU*), todos amplificaram os cDNAs e o DNA genômico, sendo que foi detectado a presença presumível de íntron no produto genômico do gene *ScGSTU17* (Figura 9). Empregando o par de iniciador do gene da classe Theta (*ScGSTT*) e os três pares de iniciadores dos genes da classe Zeta (*ScGSTZ*) também foi observado a amplificação dos cDNAs e do DNA genômico (Figura 10), sendo que
nenhum íntron parece ocorrer na região amplificada para os genes da classe Zeta, enquanto que *ScGSTT1* parece conter um íntron.



Figura 8. Amplificação de moldes com os iniciadores dos genes da classe Phi (*ScGSTF*) de cana-deaçúcar. (M) marcador de peso molecular 100 pb; (1) *pool* de cDNA do 1º ensaio; (2) *pool* de cDNA do 2º ensaio; e (3) DNA genômico de 'SP80-3280'.



Figura 9. Amplificação de moldes com os iniciadores dos genes da classe Tau (*ScGSTU*) de cana-deaçúcar. (M) marcador de peso molecular 100 pb; (1) *pool* de cDNA do 1º ensaio; (2) *pool* de cDNA do 2º ensaio; e (3) DNA genômico de 'SP80-3280'.



Figura 10. Amplificação de moldes com os iniciadores dos genes das classes Theta e Tau (ScGSTT e ScGSTZ) de cana-de-açúcar. (M) marcador de peso molecular 100 pb; (1) pool de cDNA do 1° ensaio; (2) pool de cDNA do 2° ensaio; e (3) DNA genômico de 'SP80-3280'.

Além da similaridade das seqüências de aminoácidos, as distintas classes de GST são também caracterizadas por estruturas conservadas nos genes, definida pela posição dos íntrons. No genoma de arroz, o número de íntrons/exons é conservado entre os membros da mesma classe de GST, com um íntron para os genes da classe Tau; dois íntrons para os de Phi; sete íntrons para Theta; e oito íntrons para os genes da classe Zeta (SORANZO et al., 2004). No genoma de *Arabidopsis*, o mesmo é observado para os genes da classe Tau (um íntron) e os da classe Phi (dois íntrons); já para a classe da Theta, há seis íntrons, e os da Zeta nove íntrons (WAGNER et al., 2002). Já em milho e soja, os genes da classe Tau (tipo III) também possuem um íntron; os da classe Phi (tipo I) dois íntrons; e os da classe Zeta (tipo II) nove íntrons (McGONIGLE et al., 2000).

5.3 Análise da expressão dos genes de GST em tecidos/órgãos de cana-de-açúcar

Os iniciadores desenvolvidos, específicos para cada gene de GST de cana-de-açúcar, foram então empregados para análise de expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR). Inicialmente, foi utilizado como molde um *pool* de cDNA de diversos tecidos/órgãos (limbo foliar, colmo, inflorescência, meristema e raiz), diluídos serialmente a 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ para determinação da eficiência de amplificação, R² e curva de dissociação (Tabela 6).

Dos 18 pares de iniciadores gene-específico testados, 14 (*ScGSTF3*, *ScGSTF4*, *ScGSTF5*, *ScGSTF6*, *ScGSTF14*, *ScGSTF15*, *ScGSTU1*, *ScGSTU8*, *ScGSTU13*, *ScGSTU17*, *ScGSTU31*, *ScGSTU39*, *ScGSTT1* e *ScGSTZ1*) foram considerados como funcionais na validação. A eficiência de amplificação (E) foi de aproximadamente 2, variando de 1,92 (gene *ScGSTF3*) a 2,03 (*ScGSTU1*), com coeficiente \mathbb{R}^2 maior que 0,98 (Tabela 6). Os valores médios de \mathbb{C}_T gerados nas corridas foram de 19,5 a 28,3 (dados não mostrados). Os iniciadores para *ScGSTF2*, *ScGSTU5*, *ScGSTZ2* e *ScGSTZ3* foram desconsiderados, pois seus valores médios de C_T entre 33,5 e 34,7, próximo aos obtidos para os controles negativos, sugerindo expressão extremamente baixa, com baixa precisão de detecção. Seus valores de eficiência e R² obtidos também foram abaixo do ideal. O uso de iniciadores derivados da seqüência de ESTs/*clusters* a eles associados para confirmar a variação de expressão de transcritos tem sido empregado em experimentos de RT-PCR semi-quantitativo (ASAMIZU et al., 2005), *northern blot* (FREGENE et al., 2004) ou RT-qPCR (PAPINI-TERZI et al., 2005).

Tabela 6 - Eficiência de amplificação e R² correspondente para os pares de iniciadores dos genes utilizados na RT-qPCR de amostras de tecidos/órgãos.

Par de iniciadores		R ²	
dos genes de GST (alvo)	Eficiência		
ScGSTF2	nd	nd	
ScGSTF3	1,923	0,990	
ScGSTF4	2,013	0,998	
ScGSTF5	1,995	0,995	
ScGSTF6	1,976	0,987	
ScGSTF14	1,945	0,991	
ScGSTF15	1,993	0,987	
ScGSTU1	2,030	0,993	
ScGSTU5	nd	nd	
ScGSTU8	1,988	0,985	
ScGSTU13	1,997	0,982	
ScGSTU17	2,013	0,998	
ScGSTU31	1,989	0,984	
ScGSTU39	1,975	0,989	
ScGSTT1	1,996	0,993	
ScGSTZ1	2,012	0,993	
ScGSTZ2	nd	nd	
ScGSTZ3	nd	nd	

nd: não determinado, iniciadores não funcionais para a análise.

Para se calcular o valor de expressão dos genes é necessário os valores da eficiência da reação e o C_T das amostras na amplificação (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999; BUSTIN et al., 2005). O C_T não indica diretamente a mensuração da sua transcrição, pois esta depende também da eficiência da amplificação obtida para este gene (ou cDNA) com os iniciadores específicos (PFAFFL, 2001). Este método de análise é considerado relativo, uma vez que a transcrição do gene de interesse não será expressa em número absoluto de transcritos da amostra, porém será expresso em termos da quantidade relativa de transcritos em relação a outro gene expresso e constante, denominado gene de referência. A quantificação consiste em obter a razão de expressão entre um gene alvo (de interesse) numa amostra de cDNA, em relação a outro denominado gene de referência para a mesma amostra de cDNA (PFAFFL, 2001). De acordo com Pfaffl (2001), o método relativo de quantificação é adequado para a investigação de mudanças fisiológicas em termos de expressão gênica. As tendências e processos biológicos podem ser mais bem explicados por este método, porém os resultados obtidos dependem do gene de referência escolhido e procedimentos de normalização utilizados.

O gene de referência é responsável por funções universais de importância para a manutenção do funcionamento celular, cuja expressão já foi tida como constante através dos estádios de desenvolvimento, tipos celulares/tecidos e condições fisiológicas. É importante que o gene de referência selecionado para ser o referencial da quantificação relativa mantenha uma expressão constante nas condições experimentais. Bas et al. (2004) demonstrou que a escolha equivocada do gene de referência pode resultar na alteração da validação biológica de genes de interesse. Dentre os candidatos a gene de referência (Tabela 3) para o experimento, o gene *rpl35-4* codificando uma proteína ribossômica (CALSA JR; FIGUEIRA, 2007) foi o que apresentou a menor variação quantitativa de expressão nas amostras de tecidos/órgãos de cana-de-açúcar analisados, e utilizada como referência para as análises (dados não mostrados).

A expressão dos genes de GST nos diversos tecidos/órgãos foi estimada de forma relativa ao gene de referência rpl35-4, estimadas por RT-qPCR (Tabela 7), e como referência da análise foi utilizado arbitrariamente o cDNA do limbo foliar, o tecido-alvo da aplicação dos herbicidas. Segundo Pfaffl (2001) o modelo de quantificação relativa inclui além do gene de referência, uma amostra de referência (cDNA controle) para a determinação do valor de expressão do gene alvo. De modo geral, os genes da classe Phi (ScGSTF) foram expressos em todas as amostras de tecidos/órgãos (limbo foliar, colmo, inflorescência, meristema e raiz), mas houve expressão diferencial no colmo em relação ao limbo foliar. O gene ScGSTF3 foi menos expresso no colmo, inflorescência, meristema e raiz em relação ao limbo foliar. ScGSTF4 foi mais expresso no colmo e na inflorescência. Já ScGSTF5 apresentou uma maior expressão na inflorescência seguido da raiz, enquanto que ScGSTF6 apresentou mais expressão no colmo e meristema seguido de diminuta expressão na raiz. Os genes ScGSTF14 e ScGSTF15 foram expressos em todos os tecidos (colmo, inflorescência, meristema e raiz), sendo uma expressão maior no colmo, seguido no meristema, raiz e inflorescência em relação ao limbo foliar (Tabela 7).

Os genes pertencentes à classe Tau (*ScGSTU*) foram expressos em todas as amostras de tecidos/órgãos (limbo foliar, colmo, inflorescência, meristema e raiz), mas houve uma maior expressão na inflorescência em relação ao limbo foliar (Tabela 7). O gene *ScGSTU1* foi mais expresso na inflorescência e na raiz; já os genes *ScGSTU8* e *ScGSTU13* foram menos expressos nos diversos tecidos/órgãos (colmo, inflorescência, meristema e raiz) em relação ao limbo foliar; *ScGSTU17* foi mais expresso na inflorescência seguido pela raiz. *ScGSTU31* foi mais expresso na inflorescência, seguido do nível de expressão na raiz e no colmo; e *ScGSTU39* foi expresso em todos os tecidos (colmo, inflorescência, meristema e raiz), mas houve mais expressão na inflorescência (Tabela 7). O gene *ScGSTT1* da classe Theta foi menos expresso no colmo,

meristema e raiz, em relação ao limbo foliar, enquanto que houve uma maior expressão na inflorescência. O gene *ScGSTZ1* da classe Zeta apresentou uma maior expressão nas amostras de meristema, inflorescência e colmo em relação ao limbo foliar, enquanto que na raiz houve menor expressão (Tabela 7).

Tabela 7 - Expressão relativa dos genes de GST nos diferentes tecidos/órgãos em relação ao limbo foliar calculada empregando o programa REST384. Os valores da expressão correspondem à razão entre gene de interesse (GST) e o de referência (*rpl35-4*). Valores positivos representam a expressão maior no tecido/órgão (colmo, inflorescência, meristema e raiz), valores negativos a expressão maior no limbo foliar, e valores do intervalo de confiança da variabilidade de expressão estão indicados entre parênteses.

Tecidos/Órgãos	Colmo	Inflorescência	Meristema	Raiz
Genes	(C)	(I)	(M)	(R)
ScGSTF3	-1,317	-2,549	-1,541	-5,994
	(±0,037)	(±0,023)	(±0,043)	(±0,001)
ScGSTF4	1,549	0,591	-0,01	-0,659
	(±0,210)	(±0,361)	(±0,097)	(±0,049)
ScGSTF5	-3,696	1,781	-3,400	0,776
	(±0,016)	(±0,438)	(±0,017)	(±0,279)
ScGSTF6	3,781	-2,234	2,230	0,270
	(±2,463)	(±0,101)	(±0,760)	(±0,203)
ScGSTF14	4,639	0,799	3,155	2,166
	(±1,437)	(±0,305)	(±0,273)	(±0,378)
ScGSTF15	6,229	0,461	2,318	2,168
	(±2,047)	(±0,250)	(±1,404)	(±0,445)
ScGSTU1	-0,527	1,671	-4,148	0,994
	(±0,050)	(±0,377)	(±0,005)	(±0,161)
ScGSTU8	-1,018	-1,063	-5,030	-1,825
	(±0,053)	(±0,107)	(±0,013)	(±0,069)
ScGSTU13	-6,865	-1,062	-8,096	-4,738
	(±0,003)	(±0,031)	(±0,001)	(±0,012)
ScGSTU17	-3,812	1,977	-4,681	1,217
	(±0,036)	(±0,121)	(±0,019)	(±0,479)
ScGSTU31	2,083	4,121	-2,862	2,130
	(±0,636)	(±1,305)	(±0,019)	(±0,492)
ScGSTU39	0,728	2,953	1,855	2,066
	(±0,241)	(±0,825)	(±0,122)	(±0,701)
ScGSTT1	-0,233	0,961	-0,501	-1,379
	(±0,154)	(±0,356)	(±0,152)	(±0,137)
ScGSTZ1	0,697	1,017	1,434	-0,004
	(±0,229)	(±0,311)	(±0,641)	(±0,150)

De modo geral, os genes das classes Phi e Tau foram os mais expressos nas amostras de colmo, inflorescência, limbo foliar, meristema e raiz. Estes resultados corroboram os dados de perfil de expressão relativo dos genes das quatro classes ($F, U, T \in Z$) de GSTs obtido a partir das bibliotecas de ESTs (tecidos/órgãos) disponíveis no banco de dados Saccharum Gene Index, normalizadas para o tamanho das bibliotecas (Figura 11). Esses dados de ESTs de cana-deaçúcar utilizadas derivaram das seguintes bibliotecas: colmo = SB1 + ST1 + ST3; inflorescência = FL1 + FL3 + FL4 + FL5 + FL8; limbo foliar = LV1 + LR1; meristema = AM1 + AM2; e raiz = RT1 + RT2 + RT3. Os genes da classe Phi foram os mais expressos em todas as bibliotecas de ESTs de cana-de-açúcar, principalmente nas bibliotecas de colmo e inflorescência. Entre os genes da classe Phi, ScGSTF4 foi o mais expresso em todas as bibliotecas. Genes da classe Tau também foram identificados em todas as bibliotecas, principalmente nas de limbo foliar e a raiz. O gene ScGSTU1 foi o mais expresso da classe em todas as bibliotecas, exceto na de meristema, onde não houve detecção desse EST. O gene da classe Theta (ScGSTT1) foi detectado apenas na biblioteca de limbo foliar. Já os genes da classe Zeta foram expressos em todos os tecidos/órgãos, mas com maior expressão nas bibliotecas de colmo e de raiz. O gene ScGSTZ3 foi o mais expresso da classe em relação número de ESTs para todas as bibliotecas, exceto para inflorescência onde não foi detectado (Figura 11).

A biblioteca de raiz foi a que demonstrou possuir mais ESTs das quatro classes de GST, seguido pela de limbo foliar, colmo, inflorescência e meristema. Portanto, a freqüência relativa de ESTs, normalizada para o número total das bibliotecas corroborou os resultados das análises de expressão relativa obtida para os mesmos genes de GST nas amostras de tecidos/órgãos.



Figura 11. Perfil de expressão dos genes de GST nas bibliotecas de ESTs (colmo, inflorescência, limbo foliar, meristema e raiz), disponíveis do banco de dados de *Saccharum Gene Index*.

Quando a mesma análise foi conduzida para arroz, a partir de dados obtidos de freqüência relativa de ESTs no banco de *Rice Gene Index*, foi observado que os genes das quatro classes de GST foram altamente expressos na raiz e limbo foliar (compatível ao observado em cana-de-açúcar), seguido da inflorescência e colmo (Figura 12). Não há biblioteca de meristema de arroz disponível no banco consultado. Em todos os tecidos/órgãos, os genes pertencentes às classes Phi e Tau foram os mais expressos. As bibliotecas de limbo foliar e de raiz foram aquelas com maior detecção de ESTs de GST, seguido pela biblioteca de inflorescência e colmo. Os

genes das classes Theta e Zeta foram mais expressos na raiz, seguido da inflorescência e limbo foliar. Os genes de arroz *OsGSTF4*, *OsGSTU1*, *OsGSTT1* e *OsGSTZ1* foram aqueles mais expressos em relação ao número de ESTs das classes Phi, Tau, Theta e Zeta para as diversas bibliotecas de ESTs de arroz (Figura 12).



Figura 12. Perfil de expressão dos genes de GST nas bibliotecas de ESTs (colmo, inflorescência, limbo foliar e raiz), disponíveis do banco de dados de *Rice Gene Index*.

Esses dados de expressão de GST baseados em freqüência de ESTs em bibliotecas não podem ser diretamente comparáveis devido à falta de uniformização das condições ambientais e ontogenéticas dos tecidos ou órgãos amostrados, mas servem para corroborar outras análises de expressão. Em milho, foram detectados 54% dos ESTs individuais como codificadores de GST da classe Phi; 41% da Tau e 4% da Zeta, enquanto que em soja, 92% dos ESTs de GST foram da classe Tau; 6% da Phi e 2% da Zeta (McGONIGLE et al. 2000). Já em arroz, 67% dos ESTs foram classificados com Tau; 26.6% como Phi; 5% como Zeta, e apenas 1,4% como Theta (SORANZO et al. 2004). A comparação entre os níveis de expressão e a abundância relativa às classes dos genes nas espécies acima mencionada sugere que genes de GST mais expresso podem pertencer à classe Phi (como em milho) ou Tau (em soja e arroz), indicando diferenças entre espécies, sem clara distinção entres mono e dicotiledôneas.

A expressão das diversas classes de GSTs de vegetais é altamente variável de acordo com o tecido estudado e com as condições ambientais (SORANZO et al., 2004). Em milho, a GST27.2 (classe Theta) foi altamente expressa nas pontas de raízes e relacionada a tolerância a alumínio e cádmio (CANCADO et al., 2005). Similarmente, altas concentrações de cromo promoveram um aumento da atividade de GST nas raízes de plantas de mostarda enquanto que em folhas, nenhuma alteração foi observada (PANDEY; DIXIT; SHYAM, 2005). A expressão das GSTs sendo tanto tecido-específica ou restrita a um número limitado de tecidos, já tem sido observada para plantas (MARRS, 1996; McGONIGLE et al., 2000). Várias GSTs são induzidas por hormônios, é possível que a expressão dos genes seja provocada pelo uso rotineiro de auxinas e citocininas no meio de cultura (MARRS, 1996). Portanto, não é surpreendente a expressão das GSTs em culturas de calos, visto que cultura de tecidos constitui de fatores (hormônios) que induzem inúmeros genes em resposta ao estresse.

5.4 Análise da expressão diferencial de GST nas cultivares de cana-de-açúcar

Foi investigada a expressão diferencial dos vários genes de GSTs por RT-qPCR entre as cultivares 'SP87-365' e 'SP80-3280' antes da aplicação de herbicidas (nível basal constitutivo). Inicialmente, foram testados os 18 pares de iniciadores dos gene de GST de cana-de-açúcar utilizando um *pool* de cDNA do tecido foliar das cultivares, diluídos serialmente a 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} para determinar a eficiência de amplificação (E) e o coeficiente R² obtido na curva de diluições (Tabela 8).

Par de iniciadores	Eficiência	R ²	
dos genes de GST (alvo)			
ScGSTF2	nd	nd	
ScGSTF3	1,928	0,992	
ScGSTF4	1,978	0,987	
ScGSTF5	1,996	0,996	
ScGSTF6	nd	nd	
ScGSTF14	nd	nd	
ScGSTF15	nd	nd	
ScGSTU1	1,989	0,996	
ScGSTU5	nd	nd	
ScGSTU8	1,969	0,993	
ScGSTU13	1,934	0,996	
ScGSTU17	2,002	0,995	
ScGSTU31	1,993	0,984	
ScGSTU39	nd	nd	
ScGSTT1	1,998	0,986	
ScGSTZ1	1,971	0,997	
ScGSTZ2	nd	nd	
ScGSTZ3	nd	nd	

Tabela 8 - Eficiência de amplificação e R² correspondente para os pares de iniciadores dos genes utilizados na RT-qPCR de amostras de tecido foliar.

nd: não determinado, iniciadores não funcionais para a análise.

Dos 18 iniciadores testados, 10 (*ScGSTF3*, *ScGSTF4*, *ScGSTF5*, *ScGSTU1*, *ScGSTU8*, *ScGSTU13*, *ScGSTU17*, *ScGSTU31*, *ScGSTT1* e *ScGSTZ1*) foram considerados como funcionais, com eficiência de amplificação variando entre 1,92 (gene *ScGSTF3*) e 2,00 (*ScGSTU17*) e coeficiente \mathbb{R}^2 maiores que 0,98 (Tabela 8). Os valores médios de C_T foram de 20,2 a 27,8 (dados não mostrados), bem abaixo do valor de C_T (32,8 - 34,4) dos controles negativos (sem cDNA molde). Os genes *ScGSTF2*, *ScGSTF6*, *ScGSTF14*, *ScGSTF15*, *ScGSTU5*, *ScGSTU39*, *ScGSTZ2* e *ScGSTZ3* foram desconsiderados porque seus C_T médios foram entre 32,1 e 34,5; próximos aos dos controles negativos, com valores de eficiência de amplificação e \mathbb{R}^2 abaixo do ideal, sugerindo uma baixo nível de expressão. Nas análises anteriores de expressão nas diversas amostras de tecido/órgãos da planta, foi observado que os genes *ScGSTF6*, *ScGSTF14*, *ScGSTF15* e *ScGSTU39* foram mais expressos no colmo, inflorescência, meristema e raiz do que no limbo foliar da planta (Tabela 8), e nesse ensaio foram empregadas amostras de cDNA de limbo foliar das cultivares; talvez este seja o motivo para não se obter bons valores de eficiência (E) e \mathbb{R}^2 nas corridas destes genes.

Os genes de referência não devem ser empregados nas mensurações quantitativas via PCR em Tempo Real sem serem previamente testados para as condições experimentais específicas, e questionados quanto ao objetivo (hipótese) da aplicação (HUGGETT et al., 2005). Dentre os três candidatos a referência: β -actina (Actina), Tubulina β -2/ β -3 (Tubulina) [ISKANDAR et al., 2004] e a proteína ribossômica *rpl35-4* (CALSA JR; FIGUEIRA; 2007), mais uma vez a proteína ribossômica se destacou por apresentar menor variação quantitativa na expressão nas amostras, portanto esta foi considerada como referência (dado não mostrado).

Os 10 pares de iniciadores dos genes da GST foram então analisados por RT-qPCR de forma relativa à expressão do gene de referência (*rpl35-4*), adotando de forma arbitrária a

amostra da cultivar 'SP87-365' como padrão, para ser realizada a comparação na expressão basal dos genes entre as cultivares. Foram observadas diferenças na expressão basal constitutiva dos 10 genes de GST entre as cultivares 'SP87-365' e 'SP80-3280' (Figura 13). Os genes *ScGSTF3*, *ScGSTF4*, *ScGSTU8*, *ScGSTU13* e *ScGSTU17* apresentaram expressão significativamente superior em 'SP80-3280' do que em 'SP87-365' (Figura 13). Os genes *ScGSTU1* e *ScGSTT1* apresentaram diferenças de expressão marginalmente significativas entre as cultivares. A expressão relativa dos genes *ScGSTU1* e *ScGSTT1* na 'SP80-3280' (1,349±0,190 e 1,275±0,178) foi levemente superior a da cultivar 'SP87-365' (1,065±0,097 e 1,007±0,086), respectivamente. Para o gene *ScGSTF5* ('SP80-3280'=1,163±0,191; 'SP87-365'=1,009±0,093) não houve diferenças significativa entre a expressão nas duas cultivares. Da mesma forma, a expressão dos genes *ScGSTU31* e *ScGSTZ1* não diferiram entre as cultivares, com 0,977±0,166 e 0,971 ±0,137 para 'SP80-3280' e 0,902±0,097 e 0,914 ±0,077 para 'SP87-365', respectivamente (Figura 13).



Figura 13. Expressão relativa dos genes de GST nas cultivares de cana-de-açúcar em relação ao controle interno (cultivar 'SP87-365'). Eixo X: genes referentes às quatros classes da GST. Eixo Y: os valores da expressão correspondem à razão entre gene de interesse (GST) e gene de referência (*rpl35-4*), indicando o número de vezes que o gene é expresso nas cultivares ('SP87-365' e 'SP80-3280').

De modo geral, os genes pertencentes às classes Phi e Tau foram os que evidenciaram diferenças na expressão basal dos genes de GST entre as cultivares. Os resultados de expressão basal diferencial entre as cultivares corroboram com os dados de atividade enzimática da GST entre as mesmas, que foram obtidos em nosso laboratório. Em alguns casos, um aumento na atividade da enzima GST pode ser acompanhado pelo aumento da expressão da GST, enquanto que em outros casos, a resistência ao herbicida tem resultado do aumento da atividade enzimática da GST (CUMMINS et al., 1997; CUMMINS; COLE; EDWARDS, 1999).

Para confirmar a mesma tendência de expressão dos genes entres as cultivares, foi realizada outra análise utilizando somente as amostras controle de cada cultivar (sem herbicida) a 48 h após os tratamentos. O resultado desta análise também confirmou à expressão basal diferenciada para os mesmos genes de GST entre as cultivares, como observado a 0 h, sendo a maior expressão dos genes detectada na cultivar 'SP80-3280' em relação à 'SP87-365' (dados não mostrados).

Para a análise de expressão das GSTs em resposta a aplicação dos herbicidas foi avaliada amostras das cultivares 48 h após os tratamentos (Ametryn, Diuron, Imazapic e Isoxaflutole), em relação à amostra controle (sem herbicida) de cada cultivar de modo a analisar a resposta dos genes nas cultivares expostas aos diferentes tratamentos. Inicialmente, foram testados os 18 pares de iniciadores dos gene de GST de cana-de-açúcar, utilizando um *pool* de cDNA do tecido foliar das cultivares para determinar a eficiência de amplificação (E) e o coeficiente R^2 obtido na curva de diluições (Tabela 9).

Dos 18 iniciadores testados, 10 (*ScGSTF3*, *ScGSTF4*, *ScGSTF5*, *ScGSTU1*, *ScGSTU8*, *ScGSTU13*, *ScGSTU17*, *ScGSTU31*, *ScGSTT1* e *ScGSTZ1*) foram considerados como funcionais, com eficiência de amplificação variando entre 1,92 (gene *ScGSTU31*) e 2,03 (*ScGSTF3*) e coeficiente \mathbb{R}^2 maiores que 0,98 (Tabela 9). Os 10 iniciadores validados foram os mesmos

obtidos nas análises anteriores (sem herbicidas). Os valores médios de C_T foram de 19,4 a 25,7 (dados não mostrados), bem abaixo do valor de C_T (31,8 - 34,4) dos controles negativos (sem cDNA molde). Os genes *ScGSTF2*, *ScGSTF6*, *ScGSTF14*, *ScGSTF15*, *ScGSTU5*, *ScGSTU39*, *ScGSTZ2* e *ScGSTZ3* foram desconsiderados porque seus C_T médios foram entre 31,4 e 33,8; próximos aos dos controles negativos, com valores de eficiência de amplificação e R² abaixo do ideal, sugerindo um baixo nível de expressão.

Par de iniciadores	Eficiência	\mathbf{R}^2	
dos genes de GST (alvo)	Literciteita	R	
ScGSTF2	nd	nd	
ScGSTF3	2,030	0,993	
ScGSTF4	1,975	0,998	
ScGSTF5	1,982	0,989	
ScGSTF6	nd	nd	
ScGSTF14	nd	nd	
ScGSTF15	nd	nd	
ScGSTU1	1,967	0,992	
ScGSTU5	nd	nd	
ScGSTU8	1,997	0,989	
ScGSTU13	1,972	0,994	
ScGSTU17	1,988	0,987	
ScGSTU31	1,927	0,994	
ScGSTU39	nd	nd	
ScGSTT1	2,018	0,995	
ScGSTZ1	1,962	0,987	
ScGSTZ2	nd	nd	
ScGSTZ3	nd	nd	

Tabela 9 - Eficiência de amplificação e R² correspondente para os pares de iniciadores dos genes utilizados na RT-qPCR de amostras de tecido foliar.

nd: não determinado, iniciadores não funcionais para a análise.

Os 10 genes de GST expressos nas cultivares foram então analisados por RT-qPCR de forma relativa ao gene de referência (*rpl35-4*). De modo geral, em ambas as cultivares foi

observada indução na expressão dos genes de GST na presença dos herbicidas Ametryn ou Diuron (Figura 14A-B), e repressão na expressão na presença dos tratamentos com Imazapic ou Isoxaflutole (Figura 14C-D). Os genes referentes às classes Phi e Tau foram os que tiveram sua expressão mais induzida na presença do Ametryn ou Diuron, enquanto que na presença de Imazapic ou Isoxaflutole estes tiveram expressão menos reprimida, em relação as suas respectivas amostras controle (Figura 14).

A expressão dos genes *ScGSTF3*, *ScGSTF4*, *ScGSTU8* e *ScGSTU17* na 'SP87-365' foi significativamente induzida na presença do herbicida Ametryn (Figura 14A). A expressão relativa dos genes *ScGSTU1* e *ScGSTT1* foi considerada levemente induzida na cultivar 'SP87-365', apresentando valores iguais a 1,226±0,156 e 1,181±0,130, respectivamente. Os genes *ScGSTF5*, *ScGSTU13*, *ScGSTU31* e *ScGSTZ1* foram ligeiramente reprimidos (1,029±0,295; 1,006±0,224; 1,018±0,117 e 1,020±0,026), respectivamente em relação ao controle. Já na análise da cultivar 'SP80-3280' exposta ao mesmo tratamento, foi observado que os genes *ScGSTF4*, *ScGSTU8*, *ScGSTU13* e *ScGSTU17* foram significativamente induzidos em relação ao seu controle (Figura 14A). Os genes *ScGSTU1*, *ScGSTU31* e *ScGSTU1* foram discretamente induzidos, apresentando valores de expressão iguais a 1,461±0,414; 1,344±0,279 e 1,380±0,316, respectivamente. Os genes *ScGSTF5* e *ScGSTZ1* foram levemente reprimidos (1,260±0,411 e 1,229±0,370), respectivamente em relação ao controle da cultivar.

A análise de expressão dos genes *ScGSTF4*, *ScGSTU13* e *ScGSTU17* na 'SP87-365' exposta ao tratamento com Diuron constatou uma aparente indução na cultivar em relação ao controle (Figura 14B). Os genes *ScGSTF3*, *ScGSTU8* e *ScGSTZ1* foram levemente expressos na 'SP87-365', com valores relativos a 1,362±0,263; 1,391±0,281; e 1,207±0,129, respectivamente. A expressão dos genes *ScGSTF5*, *ScGSTU1*, *ScGSTU31* e *ScGSTT1* foi discretamente reprimida na cultivar 'SP87-365' em comparação ao controle. Na análise de expressão dos genes na

cultivar 'SP80-3280' em relação a sua amostra controle, foi observado para os *ScGSTF4*, *ScGSTU8*, *ScGSTU13* e *ScGSTU17* uma significativa indução (Figura 14B). Para os genes *ScGSTF3*, *ScGSTU1*, *ScGSTU31*, *ScGSTT1* e *ScGSTZ1* esta indução foi pouco aparente mas marginalmente significativa, sendo 1,713±0,4603; 1,432±0,296; 1,315±0,298; 1,552±0,251; e 1,474±0,231, respectivamente. O gene *ScGSTF5* não foi afetado na cultivar 'SP80-3280' (1,275±0,278) em relação ao controle.

Na cultivar 'SP87-365' tratada com os herbicidas Imazapic ou Isoxaflutole, foi observado que todos dos genes (*ScGSTF3*, *ScGSTF4*, *ScGSTF5*, *ScGSTU1*, *ScGSTU8* e *ScGSTU13*, *ScGSTU17*, *ScGSTU31*, *ScGSTU31*, *ScGSTT1* e *ScGSTF4*) foram reprimidos em relação ao controle da cultivar (Figura 14 C-D). Os *ScGSTF5*, *ScGSTU31* e *ScGSTZ1* foram os genes que apresentaram a maior repressão (0,254±0,017; 0,187±0,026; e 0,070±0,033, respectivamente) na cultivar 'SP87-365' tratada com Imazapic (Figura 14C); enquanto que a cultivar exposta ao herbicida Isoxaflutole, os genes *ScGSTU1*, *ScGSTU31* e *ScGSTZ1* foram os mais reprimidos (0,296±0,065; 0,297±0,059; e 0,160±0,080, respectivamente) [Figura 14D]. Da mesma forma para 'SP80-3280' foi observado que todos os genes de GST foram reprimidos, com exceção dos *ScGSTF3*, *ScGSTF4*, *ScGSTU13* e *ScGSTU17* que significativamente não foram nem induzidos e nem reprimidos, e sim se mantiveram estáveis quando comparados ao controle (Figura 14C-D), apresentando valores iguais a 1,037±0,031; 1,082±0,024; 1,018±0,027; e 1,011±0,030, respectivamente para a cultivar tratada com Imazapic (Figura 14C) e 1,021±0,051; 1,014±0,009; 1,087±0,071; e 1,089±0,068, respectivamente para Isoxaflutole (Figura 14D).

Em geral dentre os tratamentos com herbicidas, Imazapic ou Isoxaflutole causou repressão na expressão na maioria dos genes para ambas as cultivares em relação aos respectivos controles, o primeiro herbicida pertencente ao grupo químico das imidazolinonas, e seu modo de ação é um pouco diferenciado, este inibe a enzima alostérica acetohidroxiácido sintase (AHAS),

interferindo na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina, prejudicando a síntese de proteínas, a síntese de DNA e o crescimento celular; e o segundo pertencente ao grupo químico dos isoxazoles, atua na inibição da enzima 4-hidroxifenil-piruvatodioxigenase (4HPPD), chave na biossíntese de quinona e, portanto, interfere na síntese de carotenóides, como também desestabiliza a cadeia transportadora de elétrons, impedindo o processo de fotossíntese e, conseqüentemente, promovendo inibição no crescimento e clorose mais acentuada, respectivamente. Já na presença do Ametryn ou Diuron, foi observada uma indução na expressão das GSTs as cultivares também em relação ao seu controle mostrou-se melhor reagir aos tratamentos, onde o primeiro herbicida pertencente ao grupo químico das triazinas, o modo de ação está diretamente ligado no fotossistema II, inibindo o processo de fotossíntese e conseqüentemente, atuando indiretamente na inibição do crescimento das plantas e induzindo clorose foliar; e o segundo derivado de uréia, que também atua diretamente no fotossintema II, inibindo todo o processo fotossintético e por sua vez, o crescimento do vegetal e favorecendo a clorose foliar, respectivamente.

Embora os herbicidas tenham diferentes modos de ação que são dependentes da sua classe química, os caminhos de fitotoxicidade na célula causando oxidação descontrolada são bastante similares. Isto é claramente visto por alguns herbicidas que causam branqueamento das folhas das plantas, a ação dos mesmos acabam interferindo diretamente no transporte de elétrons do fotossistema I e II ou na síntese de clorofilas e/ou pigmentos carotenóides (EDWARDS; DIXON, 2000). Não se tem nenhuma associação dos herbicidas Imazapic ou Isoxaflutole com a atividade de GST em plantas, enquanto que para os herbicidas Ametryn ou Diuron está associação a atividade da enzima já tem sido observada. Como exemplo, o herbicida Ametryn que foi aplicado nas cultivares 'SP87-365' e 'SP80-3280', a partir foi observado que a 'SP80-3280' demonstrou uma maior tolerância ao herbicida, enquanto que 'SP87-365' mostrou grande

sensibilidade. Essa diferença em tolerância ao herbicida Ametryn parece estar associada a uma maior atividade de GST em 'SP80-3280' em relação à 'SP87-365', segundo dados obtidos em nosso laboratório.

Em sorgo e milho, a desintoxicação do herbicida Cloroacetanilida é carreada pelas GSTs da classe Phi, enquanto em soja, trigo e arroz, esta atividade é atribuída às enzimas da classe Tau (EDWARDS; DIXON, 2000). Em geral, os genes (*ScGSTF3, ScGSTF4, ScGSTU13* e *ScGSTU17*) de GST que são pertencentes às classes Phi e Tau foram os mais expressos nas cultivares sob os tratamentos com os herbicidas (Ametryn, Diuron, Imazapic e Isoxaflutole) e, portanto foram considerados como possíveis candidatos que estão associados à tolerância de herbicidas em cana-de-açúcar (Figura 14). Em plantas, as GSTFs e GSTUs são as principais classes que usam a glutationa reduzida (GSH) nas reações de substituição/adição para a desintoxicação dos herbicidas (EDWARDS; DIXON, 2000).



Figura 14. Expressão relativa das GST nas cultivares de cana-de-açúcar em relação ao controle de cada cultivar (sem herbicida). Eixo X: genes referentes às classes da GST. Eixo Y: os valores da expressão correspondem à razão entre gene de interesse (GST) e gene de referência (*rpl35-4*), indicando o número de vezes que o gene é expresso nas cultivares aos diferentes herbicidas: (A) Ametryn, (B) Diuron, (C) Imazapic e (D) Isoxaflutole.

5.5 Análise por *Southern* blot

Os resultados dos *Southern* indicam a presença de um grande número de fragmentos para as hibridizações com as sondas F4 e U1 (Figura 15A-B). Para a sonda U1 (Figura 15B), a digestão com *Dra*I revelou >20 fragmentos, número similar obtido com as outras duas enzimas empregadas, associado com um rastro de fundo (*background*) sugerindo a ocorrência de número maior de cópias. Resultados similares foram obtidos para a sonda *F4*, mas com resolução inferior (Figura 15A).

Na hibridização com a sonda F4 é possível detectar uma hibridização cruzada entre a sonda de Phi e os controles negativos T1(Theta) e Z3 (Zeta), o que poderia explicar também o excesso de fragmentos hibridizados. Essa hibridização cruzada não foi evidente, mas é também detectável com a hibridização empregando a sonda U1 (Figura 15B). Entretanto, a hibridização com a sonda Z3 (Figura 15D), revelou um padrão de bandas diferente daquele obtido com a sonda F4 (Figura 15A), sugerindo que a hibridização cruzada não afeta excessivamente o perfil de fragmentos observados, e conseqüentemente não estaria associado ao número grande de cópias. Além disso, o nível de similaridade de seqüência entre genes de GST de classes distintas é baixo. No caso da hibridização com a sonda Z3 (Figura 15D), houve a detecção adequada do controle positivo, e o número de fragmentos parece ser inferior aos observados para F4 e Ul (Figura 15A-B). Houve hibridização cruzada parcial entre as sondas T1 e Z3 (Figura 15D). Um número bem menor de fragmentos pode ser observado com a hibridização com a sonda T1 (Figura 15C), observando-se de 4 a 7 bandas, sugerindo que este gene possui menos cópias/alelos. Nessa hibridização, foi necessário remover a canaleta com o controle positivo devido o excesso de hibridização. Esses resultados, ainda parciais corroboram com o número de fragmentos detectados em arroz (SORANZO et al., 2004), onde o maior número de genes pertencem as classes Phi e Tau, sendo a classe Zeta e Theta, menos freqüentes.



Figura 15. Análise de *Southern* da 'SP80-3280' utilizando sondas de GST: (A) F4 – classe Phi; (B) U1 – Tau; (C) T1 – Theta; e (D) Z3 – Zeta. M- marcador molecular λ -*Hind*III, 1- controle positivo (T1), 2- DNA digerido com a enzima DraI, 3- DNA digerido com EcoRI, 4- DNA digerido com *Hind* III e 5- controle positivo (Z3).

As GSTs de arroz não estão aleatoriamente distribuídas no genoma, a maioria dos genes das classes Phi e Tau está preferencialmente distribuídas nos cromossomos 1 e 10, respectivamente (SORANZO et al., 2004). Segundo Grove et al. (1988), as classes de GST Phi e Tau estão presentes em único ou pouco número de cópias no genoma de milho. A análise genômica sugeriu a possibilidade de uma cópia única do gene *GST27.2* entre as linhagens (Cat100-6 e S1587-17) de milho (CANCADO et al., 2005).

6 CONCLUSÕES

Foram identificados 18 genes presumivelmente codificadores de GST em cana-deaçúcar, que foram classificados por meio de análise filogenética em comparação aos genes ortólogos de arroz em sete agrupamentos da classe Phi; sete da Tau; um da Theta e três da Zeta. Os genes da classe Phi e Tau foram os mais expressos em termos de número de ESTs identificados.

A análise transcricional das GSTs nos diferentes tecidos/órgãos de cana-de-açúcar determinou que os genes pertencentes à classe Phi (*ScGSTF*) foram mais expressos no colmo em relação ao limbo foliar; das classes Tau (*ScGSTU*) e Theta (*ScGSTT*) na inflorescência, e da classe Zeta (*ScGSTZ*) no meristema. As GSTs das classes Phi e Tau foram as mais expressas nas amostras de tecidos/órgãos da planta.

Os genes (*OsGSTF4*, *OsGSTU1* e *OsGSTT1*), considerados os mais expressos na classe Phi, Tau e Theta de arroz, foram os mesmos equivalentes aos mais expressos de cana-de-açúcar (*ScGSTF4*, *ScGSTU1* e *ScGSTT1*) baseado em dados de ESTs.

O número de cópias estimado por análise de *Southern* corroborou com os dados de análise virtual aos encontrado em arroz, onde o maior número de genes pertence às classes Phi e Tau, sendo a classe Zeta e Theta, menos freqüentes.

A análise transcricional das GSTs mostrou uma expressão basal (0 h) significativamente superior dos genes das classes Phi e Tau na cultivar 'SP80-3280' em relação à 'SP87-365'.

A análise transcricional nas cultivares, 48 h após a aplicação dos herbicidas mostrou que de modo geral os genes de GST tiveram sua expressão induzida com a aplicação de Ametryn ou Diuron, ou expressão reprimida com Imazapic ou Isoxaflutole em ambas as cultivares.

Os genes *ScGSTF3*, *ScGSTF4*, *ScGSTU13* e *ScGSTU17* diferencialmente expressos de forma constitutiva nas cultivares, foram considerados como possíveis genes candidatos associados a tolerância aos diferentes herbicidas em cana-de-açúcar. Esses genes poderiam ser re-introduzidos individualmente em cana-de-açúcar sob o controle de promotor constitutivo para validar suas atuações na tolerância aos diversos herbicidas.

REFERÊNCIAS

AL-JANABI, S. M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 17, n. 3, p. 1-8, 1999.

AMES, B. N.; PROFET, M.; GOLD, L. S. Natures's chemicals and synthetic chemicals: comparative toxicology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 87, p. 7782-7786, 1990.

ANDERSON, M. P.; GRONWARD, J. W. Atrazine resistance in a velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced glutathione S-transferase activity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 1, p. 104-109, 1991.

ANDREWS, M.P. et al. Glutathione transferase activities toward herbicides used selectively in soybean. **Pesticide Science**, London, v. 51, n. 2, p. 213-222, 1997.

ARCA, P.; HARDISSON, C.; SUAREZ, J.E. Purification of a glutathione S-transferase that mediates fosfomycin resistance in bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, v. 34, n. 5, p. 844-848, 1997.

ARMSTRONG, R.N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 10, n. 1, p. 2-18, 1997.

ASAMIZU, E. et al. Comparison oh the transcript profiles from the root and the modulating root of the model legume *Lotus japonicas* by serial analysis of gene expression. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, n. 5, p. 487-498, 2005.

BARTHOLOMEW, D. M. et al. Alternative energy-dependent pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 1562-1572, 2002.

BAS, A. et al. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human Tlymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 566–573, 2004.

BOARD, P. G. et al. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. **The Biochemical Journal**, London, v. 328, p. 929-935, 1997.

BOOTH, J.; BOYLAND, E.; SIMS, P. An enzyme from rat liver catalysing conjugation with glutathione. **The Biochemical Journal**, London, v. 79, n. 3, p. 516-524, 1961.

BUSTIN, S. A. et al. Review: Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. Journal of Molecular Endocrinology, Bristol, v. 34, n.3, p. 597–601, 2005.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: A Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v. 36, n. 2, p. 214-216, 2004.

CALSA JUNIOR, T.; FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C(4) metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 63, n. 6, p. 745-762, 2007.

CANCADO, G. M. A. et al. Glutathione S-transferase and aluminum toxicity in maize. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, n. 11, p. 1045-1055, 2005.

CATANEO, A. C. et al. Glutathione transferase activity on the degradation of the herbicide glyphosate in maize (*Zea mays*) plants. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 307-312, 2003.

CHERIFI, M. et al. Atrazine metabolism in corn seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 39, n. 7, p. 665-672, 2001.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 159-182, 2002.

COMBES, B.; STAKELUM, G. S. A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 40, n. 6, p. 981-988, 1961.

CUMMINS, I. et al. Glutathione transferases in herbicide-resistant and herbicide-susceptible black-grass (*Alopecurus myosuroides*). **Pesticide Science**, London, v. 51, n. 3, p. 244-250, 1997.

CUMMINS, I.; COLE, D. J.; EDWARDS, R. A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 285-292, 1999.

CUMMINS, I.; COLE, D. J.; EDWARDS, R. Purification of multiple glutathione S-transferases involved in herbicide detoxification from wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with the safener fenchlorazole-ethyl. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 59, p. 35-49, 1997.

DANIELSON, U.; MANNERVIK, B. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. **The Biochemical Journal**, London, v. 231, n. 2, p. 263-267, 1985.

DEAN, J. V.; GROWNWALD, J. W.; EBERLEIN, C. V. Induction of glutathione S-transferase isozymes in sorghum by herbicide antidotes. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 92, n. 2, p. 467-473, 1990.

DINELLI, G. et al. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyfosate in *Conysa canadensis* (L.). **Pesticide Biochemistry Physiology**, New York, v. 86, p. 30-42, 2006.

DIRR, H.; REINEMER, P.; HUBER, R. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferase. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 220, n. 3, p. 645-661, 1994.

DIXON, D.; COLE, D. J.; EDWARDS, R. Characterization of multiple glutathione transferases containing the GST I subunit with activities toward herbicide substrates in maize (*Zea mays*). **Pesticide Science**, London, v. 50, n. 1, p. 72-82, 1997.

DIXON, D.P.; DAVIES, B. G.; EDWARDS, R. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants - Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 34, p. 30859-30869, 2002.

DIXON, D. P.; LAPTHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. Genome Biology, London, v. 3, n. 3, p. 1-10, 2002.

DIXON, D. P. et al. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. Current Opinion in Plant Biology, London, v. 1, n. 3, p. 258-266, 1998.

DIXON, D. P. et al. Forced evolution of an herbicide detoxifying glutathione transferase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 26, p. 23930-23935, 2003.

DROOG, F. N. Plant glutathione S-transferase, a tale of theta and tau. Journal of Plant Growth Regulation, New York, v. 16, n. 2, p. 95-107, 1997.

DROOG, F. N.; HOOYKAAS, P. J. J.; VAN DER ZAAL, B. J. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxin-regulated type-III tobacco glutathione S-transferase. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 107, n. 4, p. 1139-1146, 1995.

EDWARDS, R.; OWEN, W. J. Comparison of glutathione S-transferase of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension-cultured cells. **Planta**, Berlin, v. 169, n. 2, p. 208-215, 1986.

EDWARDS, R.; COLE, D. J. Glutathione transferase in wheat (Triticum) species with activity toward fenoxaprop-ethyl and other herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 54, n. 2, p. 96-104, 1996.

EDWARDS, R.; DIXON, D. P. The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. In: COBB, A. H.; KIRKWOOD, R. C. (Ed.). Herbicides and their mechanisms of action. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press, 2000. p. 38-71.

EDWARDS, R.; DIXON, D. P.; WALBOT, V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and health. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 5, p. 193-198, 2000.

EDWARDS, R. et al. Chemical manipulation of antioxidant defenses in plants. Advances in Botanical Research, London, v. 42, p. 1-32, 2005a.

EDWARDS, R. et al. Differential induction of glutathione transferases and glucosyltransferases in wheat, maize and *Arabidopsis thaliana* by herbicide safeners. **Zeitschrift Für Naturforschung**, Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, v. 60, p. 307-316, 2005b.

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

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. Genome Research, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998.

FEINBERG, A. P.; VOLGELSTEIN, B. A technique for radiolabelling DNA restriction fragments to high specific activity. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 132, n. 1, p. 6-13, 1983.

FELSENTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, Lawrence, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FIGUEIRA, S. R. Os programas de álcool combustível nos EUA, Japão e União Européia e as possibilidades de exportação do Brasil. 2005. 245 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Cana. In:_____. Agrianual 2007: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2007, p. 237-244.

FOYER, C. H.; THEODOLOU, F. L.; DELROT, S. The functions of inter- and intracellular glutathione transport system in plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, n. 10, p. 486-492, 2001.

FRAGA, M. I.; TASENDE, M. G. Mechanisms of resistance to simazine in *sonchus oleraceus*. **Weed Research**, Oxford, v. 43, n. 5, p. 333-340, 2003.

FREAR, D.S.; SWANSON, H.R. Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione partial purification and properties of glutathione S-transferase from corn. **Phytochemistry**, Oxford, v. 9, p. 2123-2132, 1970

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, Natick, v. 26, n. 1, p. 112-122, 124-125, 1999.

FREGENE, M. et al. Serial analysis of gene expression of host-plant resistance to the cassava mosaic disease (CMD). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, n. 4, p. 563-571, 2004.

FROVA, C. The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 119, n. 4, p. 469-479, 2003.

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. **Biomolecular Engineering**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 149-169, 2006.

GARDNER, S. N. et al. A revolving dose strategy to delay the evolution of both quantitative vs. major monogene resistances to pesticides and drugs. **International Journal of Pest Management**, London, v. 44, n. 3, p. 161-180, 1998.

GRONWALD, J. W. et al. Effect of herbicide antidotes on glutathione content and glutathione S-transferase activity of sorghum shoots. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 29, n. 66-76, 1987.

GROVE, G. et al. Characterization and heterospecific expression of cDNA clones of genes in the maize GSH S-transferase multigene family. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 425-438, 1988.

HAHN, K.; STRITTMATTER, G. Pathogen-defence gene prp1-1 from potato encodes an auxinresponsive glutathione S-transferase. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 226, n. 2, p. 619-626, 1994.

HAROLD, J.; OTTEA, J.A. Toxicological significance of enzyme activities in profenofosresistant tobacco budworms, *Heliothis virescens*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 58, n. 1, p. 23-33, 1997.

HATTON, P. J. et al. Glutathione transferase activities and herbicide selectivity in maize and associated weed species. **Pesticide Science**, London, v. 46, n. 3, p. 267-275, 1996.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. Annual Review Pharmacology Toxicology, Palo Alto, v. 45, p. 51-88, 2005.

HIRASE, K.; MOLIN, W. Measuring cysteine biosynthesis activity from serine in extracts from sorghum, corn and grass weeds, and their metolachlor susceptibility. Weed Biology and Management, Carlton, v. 2, n. 1, p. 52-59, 2002.

HOLT, D. C. et al. Characterization of the safener-induced glutathione S-transferase isoform II from maize. **Planta**, Berlin, v. 196, n. 2, p. 295-302, 1995.

HOLT, J. S.; POWLES, S. B.; HOLTUM, J. A. M. Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 44, p. 203-229, 1993.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Research, Woodbury, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. Genes and Immunity, Houndmills, v. 6, n. 4, p. 279-284, 2005.

HUNATTI, A. A.; ALI, B. R. Glutathione S-transferase from oxadiazon treated chickpea. **Phytochemistry**, New York, v. 29, n. 8, p. 2431-2435, 1990.

HUNATTI, A. A.; ALI, B. R. The induction of chickpea glutathione S-transferase by oxadiazon. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 7, p. 2131-2134, 1991.

ISKANDAR, H. M. et al. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression. **Plant Molecular Biology Reporter**, Ottawa, v. 22, n. 4, p. 325-337, 2004.

JABLONKAI, I.; HATZIOS, K. K. Role of glutathione and glutathione S-transferase in the selectivity of acetochlor in maize and wheat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 41, p. 221-231, 1991.

JEPSON, I. et al. Cloning and characterization of maize herbicide safener-induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isoform I, II and IV. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, n. 6, p. 1855-1866, 1994.

KAMPRANIS, S. C. et al. A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses bax lethality in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 38, p. 29207-29216, 2000.

KARAVENGELI, M. et al. Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. **Biomolecular Engineering**, Elsevier, v. 22, n. 4, p. 121-128, 2005.

KLEIN, M.; BURLA, B.; MARTINOIA, E. The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, n. 4, p. 1112-1122, 2006.

KOEPPE, M. K. et al. Basis of selectivity of the herbicide flupyrsulfuron-methyl in wheat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 59, n. 2, p. 105-117, 1997.

KOONIN, E. V. et al. Eukaryotic translation elongation factor 1-gamma contains a glutathione transferase domain – study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. **Protein Science**, Woodbury, v. 3, n. 11, p. 2045-2054, 1994.

KUNIEDA, T. et al. Molecular cloning and characterization of a senescence-induced tau-class glutathione S-transferase from barley leaves. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v. 46, n. 9, p. 1540-1548, 2005.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 48, p. 251-275, 1997.

LOYALL, L. et al. Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 10, p. 1393-1950, 2000.

MANNERVIK, B.; DANIELSON, U. H. Glutathione S-transferase – structure and catalytic activity. **CRC Critical Reviews in Biochemistry**, Cleveland, v. 23, n. 3, p. 283-337, 1988.

MARRS, K. A. et al. Glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze - 2. Nature, London, v. 375, n. 6530, p. 397-400, 1995.

MARRS, K. A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 47, p. 127–158, 1996.

MARRS, K. A.; WALBOT, V. Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase bronze2 gene is regulated by cadmium and other stresses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 1, p. 93-102, 1997.

MAUCH, F.; DUDLER, R. Differential induction of distinct glutathione S-transferase of wheat by xenobiotics and by pathogens attack. **Plant Physiology**, Rockville, v. 102, n. 4, p. 1193-1201, 1993.

McGINNIS, S.; MADDEN, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, p. 20-25, 2004.

McGONIGLE, B. et al. A genomic approach to the comprehensive analyses of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 1105-1120, 2000.

McLELLAN, L. I.; WOLF, C. R. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, Edinburg, v. 2, n. 3, p. 153-164, 1999.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. Annual Review of Biochemistry, Palo Alto, v. 52, p. 711-760, 1983.

MEYER, R. C.; GOLDSBROUGH, P. B.; WOODSON, W. R. An ethylene-responsive flower senescence-related gene from carnation encodes a protein homologous to glutathione S-transferase. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 17, n. 2, p. 227-281, 1991.

MUELLER, L. A. et al. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. **Plant Physiology,** Lancaster, v. 123, n. 4, p. 1561-1570, 2000.

NEUEFEIND, T. et al. Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoyglutathione: evidence for an induced-fit mechanism. Journal of Molecular Biology, London, v. 274, n. 4, p. 446-453, 1997a.

NEUEFEIND, T. et al. Cloning, sequencing, crystallization and X-ray structure of glutathione S-transferase-III from *Zea mays* var. mutin: a leading enzyme in detoxification of maize herbicides. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 4, n. 4, p. 577-587, 1997b.

NUTRICATI, E. et al. Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferase. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 9, p. 997-1005, 2006.

OWEN, M. D.; ZELAYA, I. A. Herbicide resistance crops and weed resistance to herbicides. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 61, n. 3, p. 301-311, 2005.

OWEN, W. J. Herbicide metabolism as a basis for selectivity. In: ROBERTS, T. (Ed.). **Metabolism of agrochemicals in plants**. New York: John Wiley, 2000. cap. 7, p. 211-258.

PAGE, R. D. M. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 357-358, 1996.

PANDEY, V.; DIXIT, V.; SHYAM, R. Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. pusa jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium. **Chemosphere**, Oxford, v. 61, n. 1, p. 40-47, 2005.

PAPINI-TERZI, F. S. et al. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. **DNA Research**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 27-38, 2005.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLE, L. Relative expression software tool (REST) for groupwise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

PFAFFL, M.W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

PONTING, C. P.; RUSSELL, R. R. The natural history of protein domains. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, Palo Alto, v. 31, p. 45-71, 2002.

RANSON, H.; PRAPANTHADARA, L.; HEMINGWAY, J. Cloning and characterization of two glutathione S-transferase from a DDT - resistant strain of *Anopheles gambiae*. **The Biochemical Journal**, London, v. 324, p. 97-102, 1997.

RANSON, H.; COLLIN, F.; HEMINGWAY, J. The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the *Anopheles gambiae* class I glutathione S-transferase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 95, n. 24, p. 14284-14289, 1998.

READE, J. P. H.; MILNER, L. P.; COBB, A. H. A role for glutathione S-transferase in resistance to herbicide in grasses. **Weed Science**, Champaign, v. 52, n. 3, p. 468-474, 2004.

REICHHELD, J. P. et al. Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 647-656, 1999.

REINEMER, P. et al. Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2Å resolution: structural characterization oh herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 255, n. 2, p. 289-309, 1996.

RIECHERS, D. E. et al. Variability of glutathione S-transferase levels and dimethenamid tolerance in safener-treated wheat and wheat relatives. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 56, n. 2, p. 88-101, 1996.

RIECHERS, D. E. et al. Partial characterization of glutathione S-transferases from wheat (*Triticum* spp.) and purification of a safener-induced glutathione S-transferase from *Triticum tauschii*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 114, n. 4, p. 1461-1470, 1997.

ROMANO, M. L. et al. The effect of monooxygenase and glutathione S-transferase inhibitors on the metabolism of diclofop-methyl and fenoxaprop-ethyl in barley and wheat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 46, n. 3, p. 181-189, 1993.

ROSSINI, L. et al. Characterization of glutathione S-transferase isoforms in three maize inbred lines exhibiting differential sensitivity to alachlor. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 4, p. 1595-1600, 1996.

SALINAS, A. E.; WONG, M. G. Glutathione S-transferase – A review. Current Medicinal Chemistry, Schiphol, v. 6, p. 279-309, 1999.

SCALLA, R.; ROULET, A. Cloning and characterization of a glutathione S-transferase induced by a herbicide safener in barley (*Hordeum vulgare*). **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 116, n. 3, p. 336-344, 2002.

SCARPONI, L.; ALLA, M. N.; MARTINELLI, T. Metolachlor in corn (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*): persistence and biochemical signs of stress during its detoxification. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 40, p. 884-889, 1992.

SCARPONI, L.; DEL BUONO, D.; VISCHETTI, C. Persistence and detoxification of Pretilachor and Fenclorin in rice (*Oryza sativa*). Agronomie, Madison, v. 23, p. 147-151, 2003.

SERENO, M. L. et al. Response of sugarcane to increasing concentrations of copper and cadmium and expression of metallothionein genes. Journal of Plant Physiology, Stuttgart, 2006. doi:10.1016/j.jplph.2006.09.007.

SHANER, D. L. Herbicide safety relative to common targets in plants and mammals. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 60, n. 1, p. 17-24, 2003.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **The Biochemical Journal**, London, v. 360, n. 1, p. 1-16, 2001.

SHIMABUKURO, R. H.; SWANSON, H. R.; WALSH, W. C. Glutathione conjugation: atrazine detoxification mechanism in corn. **Plant Physiology**, Rockville, v. 46, p. 103-107, 1970.

SINGHAL, S. S. et al. Purification and characterization of glutathione S-transferase from sugarcane leaves. **Phytochemistry**, New York, v. 30, p. 1409-1414, 1991.

SORANZO, N. et al. Organization and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. **Molecular Genetics and Genomics,** Berlin, v. 271, n. 5, p. 511-521, 2001.

SWOFFORD, D. L. **PAUP***: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0 Beta. Sunderland: Sinauer Associates, 1998.

TANG, A. H.; TU, C. P. Biochemical characterization of Drosophila glutathione S-transferase D1 and D21. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 269, n. 45, p. 27876-27884, 1944.

TEW, K. D. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. **Cancer Research**, Baltimore, v. 54, n. 16, p. 4313-4320, 1994.
THOM, R. et al. Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. **Biochemistry**, Washington, v. 41, n. 22, p. 7008-7020, 2002.

TRANEL, P. J.; WRIGHT, T. R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, Champaign, v. 50, n. 6, p. 700-712, 2002.

ULMASOV, T. et al. The soybean GH2/4 gene that encodes a glutathione S-transferase has a promoter that is activated by a wide range of chemical agents. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 108, n. 3, p. 919-927, 1995.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. **Estatísticas**. Disponível em <http://www.portalunica.com.br>. Acesso em: 14 jun. 2007.

VUILLEUMIER, S.; PAGNI, M. The elusive roles of bacterial glutathione S-transferase: news lessons from genomes. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 58, n. 2, p. 138-146, 2002.

WAGNER, U. et al. Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 49, n. 5, p, 515-532, 2002.

WERCK-REICHHART, D.; HEHN, A.; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, Killington, v. 5, n. 3, p. 116-123, 2000.

WILCE, M. C.; PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1205, n. 1, p. 1-18, 1994.

WOLF, A. E.; DIETZ, K. J.; SCHRODER, P. Degradation of glutathione S-transferase conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 384, n. 1, p. 31-34, 1996.

YUN, M. S. et al. Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). **Pesticide biochemistry and physiology**, New York, v. 83, n. 2, p. 107-114, 2005.

ZABLOTOWICH, R. M. et al. Glutathione S-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by Rhizosphere bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 1054-1060, 1995.

APÊNDICE

Apêndice A - Resultado obtido no sequenciamento das 17 seqüências referentes às GSTs de cana-deaçúcar após a análise quanto à qualidade, redundância e presença de vetor no programa Phred/Phrap/Crossmatch. Seqüência do produto de amplificação dos genes representa em negrito e o par de iniciador específico sublinhado.

>ScGSTF2

>ScGSTF3

>ScGSTF4

>ScGSTF5

>ScGSTF6

>ScGSTF14

>ScGSTF15

>ScGSTU1

>ScGSTU5

>ScGSTU8

>ScGSTU13

>ScGSTU17

>ScGSTU31

>ScGSTU39

>ScGSTT1

>ScGSTZ1

>ScGSTZ3