SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO L.B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANDRÉA DIAS BRANDÃO

Efeito da Giberelina A₃ e do Paclobutrazol no Metabolismo de Carboidratos e Expressão Gênica em Plântulas de Cana-de-Açúcar (*Saccharum* sp.)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) manon ias Riandas e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Vegetal.

dun

Orientador: Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B734e	Brandão, Andrea Dias Efeito da giberelina A3 e do paclobutrazol no metabolismo de carboidratos e expressão gênica em plântulas de cana-de-açúcar (S <i>accharum</i> spp.) / Andrea Dias Brandão. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.
	Orientador: Marcos Silveira Buckeridge. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
1. Cana-de-a em cadeia de po Carboidratos. I. Universidade Es III. Título.	 Cana-de-açúcar. 2. Ácido giberélico. 3. Reação em cadeia de polimerase via transcriptase quantitativa. 4. Carboidratos. I. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
	(rcdt/ib)

Título em inglês: Effect of gibberellic acid (A3) and the paclobutrazol in the carbohydrates metabolism and the genetic expression in sugarcane seedlings. Palavras-chave em inglês: Sugarcane; Gibberellic acid; Quantitative real-time polymerase chain reaction; Carbohydrates. Área de concentração: Biologia Vegetal. Titulação: Doutora em Biologia Vegetal. Banca examinadora: Marcos Silveira Buckeridge; Carlos Takeshi Hotta, Sabrina Moutinho Chabregas, Iran Malavazi, Raul Santin Almeida. Data da defesa: 25/01/2010. Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal. Campinas, 25 de fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge (Orientador)

Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta

Profa. Dra . Sabrina Moutinho Chabregas

Prof. Dr. Jorge Vega

Prof. Dr. Raul Santin Almeida

Prof. Dr. Iran Malavazi

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Prof. Dr . Ladaslav Sodek

Assinatura Calos Labadi Katu Assinatura

A.C.L

allaa Assinatura

Assinatura 41 Assinator

Iran molou Assinatura

Assinatura

Assinatura

iii

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de realização do curso;

Ao Professor Dr. Marcos Silveira Buckeridge pela orientação;

Aos Laboratórios do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo e ao laboratório de Genética de Plantas do CBMEG (Dr. Michel Vincentz), pela realização dos experimentos;

Ao CTC pela doação das sementes em especial ao Dr. Eugênio Ulian e Dra. Sabrina M. Chabregas;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo;

À FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro no âmbito do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (INCT do Bioetanol).

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia, pelo apoio financeiro durante o projeto.

A Dra. Glaucia Mendes Souza, Dr. Gilberto Barbante Kerbauy, Dr. Gregório Ceccantini pela colaboração;

À minha família, em especial meu companheiro para todos os momentos Ricardo J. A. Silva, aos meus filhos Nicolas e Renan e a minha irmã Aline Dias Brandão; aos meus amigos do laboratório de Transdução de Sinal (USP-IQ), em especial: Carolina Lembke, Paloma, Max, Rodrigo, Milton. Carlos; a todos os meus amigos e colegadas de trabalho, técnicos envovidos com o laboratório de Fisiologia Vegetal (USP), em especial: Giovana Bezzera, Mari, Mauro, Adriana Yepes, colegas de trabalho Bianca Brasil, Lia Chaer; aos meus amigos do laboratório de Biologia Celular (USP), em especial a profa. Eny por permitir tantas vezes o uso de equipamentos; aos colegas do departamento de Anatomia Vegtal (USP), em especial a técnica

todos os profissionais e amigos que cruzaram o meu longo caminho, por toda ajuda e incentivo durante o curso.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS				
ÍNDICE	vii			
LISTA DE ABREVIATURAS	X			
RESUMO GERAL				
SUMARY	xiii			
LISTA DE FIGURAS	XV			
LISTA DE TABELAS	xvii			
LISTA DE ANEXOS	xviii			
1. INTRODUÇÃO GERAL				
 1.1 Histórico e importância econômica da cana-de-açúcar 1.2 Fotossíntese em plantas C4 1.2.1 Metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar 1.2 Dere de saledor experimentador experimentador e saledor e sale				
 1.3 Parede celular: aspectos gerais 1.3.1 Parede celular de Gramíneas 1.4 Germinação de sementes in vitro 				
1.4.1 Constituição do meio de cultura2. REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS				
PARTE I – Determinação das condições ótimas de cultivo) e avaliação do desenvolvimento			
de plântulas e do metabolismo de carboidratos en	n plântulas de cana-de-açúcar			
RESUMO				
SUMARY				
1. INTRODUÇÃO				
1.1 Cultivo e desenvolvimento da cana-de-açúcar1.2 Plântulas como modelo de estudo2. OBJETIVOS				
3. MATERIAL E MÉTODOS				
 3.1 Material vegetal e condições de cultivo 3.2 Preparação do meio de cultura 3.3 Tratamentos realizados				
 3.4 Delineamento experimental e análises estatísticas 3.5 Quantificação de carboidratos solúveis 				
3.6 Quantificação de açúcares redutores				

3.7 Extração e análise dos monossacarídeos neutros da parede celular	. 37
3.8 Quantificação de amido	. 37
4. RESULTADOS	. 39
4.1 Assepsia das sementes	39
4.2 Efeito da composição do meio de cultura, horário de coleta do material vegetal	e as
metodologias para análises dos carboidratos	40
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
PARTE II - Efeito do GA ₃ sobre o metabolismo de carboidratos e de genes possivelm	ente
relacionados com esse processo em plântulas de cana-de-açúcar cultivadas in vitro	53
RESUMO	53
SUMARY	55
1. INTRODUÇÃO	57
1.1 Transporte e armazenamento da sacarose no tecido vegetal	. 57
1.2 Cana-de-açúcar e características de interesse	60
1.3 A cana-de-açúcar e o projeto Sucest	61
1.4 Fitormônios	63
1.4.1 Giberelinas	63
1.4.1.1 Aplicabilidade das giberelinas	65
1.5 Paclobutrazol	68
1.6 Fatores reguladores da transcrição gênica	. 70
1.7 Genes alvos	71
2. OBJETIVOS	73
3. MATERIAL E MÉTODOS	. 74
3.1 Material vegetal e condições de cultivo	74
3.2 Preparação do meio de cultura	74
3.3 Tratamentos realizados	. 75
3.4 Parâmetros avaliados	. 76
3.5 Delineamento experimental e análises estatísticas	. 76
3.6 Preparação do material vegetal para microscopia óptica (MO)	76
3.7 Análises morfológicas	77
3.8 Análises bioquímicas	77
3.8.1 Extração e análises dos açúcares solúveis totais	77
3.8.2 Extração e análises dos monossacarídeos neutros da parede	79
3.9. Análises moleculares	81
3.9.1 Extração e análise do RNA total	81

3.9.2 Purificação do RNA total	82
3.9.3 Extração e purificação do RNA do material biológico	. 82
3.9.4 Reações de transcrição reversa para PCR em tempo real	. 83
3.9.5 Reação de PCR em tempo real (qRT-PCR)	. 84
3.9.6 Validação dos dados de expressão gênica	. 85
3.9.7 Desenho dos primers	. 86
3.9.8 Normalizadores	. 86
3.9.9 Catálogo Sucast	88
4. RESULTADOS	. 90
4.1 Influência do GA ₃ no metabolismo de carboidratos e na partição de carbono em plântula cana-de-acúcar	.s de . 90
4.2 Influência de diferentes concentrações de GA ₃ e de PBZ na incorporação de massa fres	ca e
partição de carbono em plântulas de cana-de-açúcar em relação ao tempo de tratamento	94
4.3 Influência do GA ₃ e do PBZ na expressão gênica de plântulas de cana-de-açúcar após 21	dias
de tratamento	104
5. DISCUSSÃO	111
5.1 Influência do GA ₂ e do PBZ no metabolismo de carboidratos e na partição de carbonos	em
plântulas de cana-de-acúcar	111
5.2 Influência do GA ₃ , de PBZ na incorporação e partição de massa fresça em plântulas de c	ana-
de-acúcar em relação ao tempo de tratamento	120
6. CONCLUSÕES	151
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152
8 ANEXOS	182
	104

LISTA DE ABREVIATURAS

- C₃ Plantas com metabolismo C3
- C₄ Plantas com metabolismo C4
- CAM Plantas de metabolismo do ácido das crassuláceas
- UDP Uridina difosfato
- Pi Fosfato inorgânico
- sp. espécie
- CTC Centro de Tecnologia Canavieira
- MS meio de cultura Murashige & Skoog
- EDTA Ácido etilenodiaminotetracético
- GOD-POD reagente contendo glucose-oxidase e peroxidase, 4-aminoantipirina e fenol
- HPAEC High Performance Anion Exchange Chromatography
- AST açúcar solúvel total
- AR açúcar redutor
- NIPE Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- LCH Complexo de fotosistema I (PSI) e fotossitema II (PSII)
- PEPC fosfoenol piruvato carboxilase
- GA3 ácido giberélico
- PBZ paclobutrazol
- GAs giberelinas
- AUX auxina
- ABA ácido abcísico

RESUMO GERAL

A cana-de-açúcar pertence a família Poaceae e ao gênero Saccharum. Espécies pertencentes a essa família apresentam a via de fotossíntese C₄, mais eficiente para a produção de biomassa quando comparadas com as plantas com metabolismo fotossintético C3 em condições de temperaturas elevadas. A cana-de-açúcar transformou-se em um importante potencial econômico e fonte de energia no mundo, devido a sua capacidade de estocar sacarose (cerca de 50% de seu peso seco) e produzir bioetanol. Nos últimos anos tornou-se alvo prioritário para diversos estudos através do melhoramento genético, biologia molecular, bioquímica e estudos fisiológicos. Os produtos provenientes da cana são amplamente utilizados pela população mundial e representam uma fonte alternativa para a geração de energia. O Brasil ocupa uma posição de destaque entre os países produtores de cana-de-áçúcar (34% da produção mundial). Devido a sua origem interespecífica a cana possui um dos genomas mais complexos entre as espécies vegetais tornando-se um importante objeto de estudo para a obtenção de variedades produtivas e ou eficientes, melhor adaptadas às condições climáticas. A propagação clonal através do cultivo in vitro possibilita a obtenção mais rápida de indivíduos da espécie. A utilização de métodos de assepsia para a desinfestação e desinfecção sem causar danos aos tecidos que levam a morte da planta tornou-se um grande desafio para a obtenção de novas plântulas que permitam os estudos de biotecnologia. E o grande interesse em se estudar plantas de cana-de-açúcar se dá pelo acúmulo da sacarose, que ocorre na região do entrenó durante o desenvolvimento da planta. A genética clássica busca a melhora dessa característica, principalmente através do aumento da biomassa realizada pela fixação de carbono, no entanto, há um limitado aumento do conteúdo de sacarose. A giberelina é um fitormônio vegetal, largamente utilizada na agricultura e desempenha uma variedade de funções fisiológicas em plantas. O GA₃ produzido industrialmente tem sido aplicado para estimular o crescimento da cana-de-açúcar, para auxiliar a germinação de cevada, na produção de frutas e verduras, entre outras. As giberelinas são extremamente ativas na indução do alongamento do caule. Estudos mostram que a aplicação de GAs provoca aumento no tamanho da célula e no número de células, indicando que as GA_s atuam tanto no alongamento da célula como na divisão celular, o que potencializa um aumento na produtividade de sacarose. Já o paclobutrazol (PBZ) atua inibindo a biossíntese de giberelinas. Ele bloqueia a biossíntese de GA, pois interfere nos primeiros passos da rota de oxidação do caureno, impedindo a formação das GAs, e por isso funciona como um controle negativo dos mecanismos de ação das giberelinas. Tanto a presença do paclobutrazol quanto da GA₃ induzem alterações da expressão de genes específicos e a ativação de vias de sinalização que agem cooperativamente na tentativa de aliviar o efeito do estresse na tentativa de estabelecer o retorno à homeostasia celular. Nosso maior objetivo nesse estudo é tentar identificar o mecanismo de ação das GAs, para permitir uma melhor compreensão das alterações tanto morfológicas e fisiológicas sofrida pelas plântulas. Para isso em nossos estudos foram selecionados genes que pudessem apresentar relação com metabolismo de carboidratos, com respostas hormonais, com metabolismo de ácidos nucleícos, com a fotossíntese, com o desenvolvimento, com divisão celular, com metabolismo de proteínas, além de diversos fatores de transcrição que possam estar envolvidos nesses processos, baseados em resultados do metabolismo de carboidratos encontrados nas analises bioquímicas das plântulas, assim como nos cortes anatômicos. O resultados mostraram interferência do GA3 no acúmulo de carboidratos, no alongamento celular, em genes relacionados com a via de transdução de sinal das AUX, biossíntese de AUX, GA, além de genes e fatores de transcrição relacionados com o ciclo celular, fotossíntese, fixação de carbono e diversos estresses, entre eles o osmótico.

SUMMARY

The sugarcane belongs to the grasses's family and the Saccharum genus. Species belonging to this family have the C₄ photosynthesis patway, more efficient for biomass production when compared the C_3 photosynthetic metabolism plants, in high temperature condicions. The sugarcane became an important economic potential and energy in the world due to its ability to store sucrose (about 50% of its dry weight) and production of bioethanol. In recent years it has become priority for several studies through breeding, molecular biology, biochemistry and physiological studies. Products from sugarcane is widely used by the world's population and represent an alternative source for energy generation. Brazil occupies an outstanding position among the countries producing sugarcane (34% of world production). Because of its interspecific origin, the sugarcane has one of the more complex genomes of plant species became an important object of study for plant breeding and productive or efficient, better adapted to climatic conditions. The clonal propagation through in vitro possible to obtain faster plants copies. The use of aseptic methods for disinfestation and disinfection without causing tissue damage leading to death of the plant has become a major challenge for the procurement of new seedlings to allow the biotechnology study. And the great interest in studying sugarcane plant is caused by the accumulation of sucrose, which occurs in the internode region during the plant development. Classical genetics search to improve this feature, mainly by increasing the biomass held by sequestration, however, there is a limited increase in sucrose content. The gibberellin is a plant phytohormone widely used in the agriculture and plays a variety of physiological functions in the plants. The sintetic GA₃ has been applied to stimulate the sugarcane growth, to assist the germination of barley, the production of fruits and vegetables, among others. The gibberellins are extremely active in inducing the elongation of the stem. Studies show that the application of GAs

causes an increase in cell size and cell number, indicating that GAs act both in cell elongation and cell division, which leverage an increase in sucrose yield. Since the PBZ acts by inhibiting the biosynthesis of gibberellins. It blocks the biosynthesis of GA, because it interferes in the first steps of the kaurene oxidation patway, preventing the GAs formation, and therefore acts as a negative control mechanisms of action of gibberellins. Both the presence of paclobutrazol and the GA_3 induced changes in gene expression and activation of specific signaling pathways that act cooperatively in trying to alleviate the effect of stress in trying to establish a return to cellular homeostasis. Our objectivity in this study is to try to identify the mechanism of action of GAs to allow a understanding of both morphological and physiological changes experienced by seedlings. To do this in our studies we selected genes that could present relationship with carbohydrate metabolism, hormonal responses, with the metabolism of nucleic acids, through photosynthesis, with the development, with cell division, with protein metabolism, and several transcription factors that may be involved in these processes, based on results of the metabolism of carbohydrates found in the biochemical analysis of the seedlings, as well as in anatomical cuts. The results showed interference of GA_3 in the accumulation of carbohydrates in cell elongation in genes related to the route of signal transduction of AUX, AUX biosynthesis, GA, in addition to genes and transcription factors related to cell cycle, photosynthesis, fixing carbon and many stresses, including the osmotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do cultivo da cana-de-açúcar no mundo
Figura 2. Mapeamento do plantio da cana-de-açúcar no Brasil4
Figura 3A. Anatomia Kranz de folhas de plantas C ₄
Figura 3B. Ciclo do ácido málico em plantas com anatomia Kranz (C ₄)6
Figura 4 – Modelo de organização estrutural de paredes celulares encontradas em gramíneas
Figura 5 – Glucuronoarabinoxilano presente em gramíneas
Figura 6. Ciclo evolutivo da cana de 12 e 18 meses, na região Centro-Sul do Brasil
Figura 7. Plântulas de cana-de-açúcar cultivadas in vitro em meio de cultura MS
Figura 8. Esquema das principais etapas da extração de açúcares solúveis e monossacarídeos
Figura 9 A. Teores de açúcares solúveis totais ; B. Teores de açúcares redutores na parte aérea
de plântulas de cana-de-açúcar com 28 dias de tratamento em meio MS
Figura 10. Composição dos monossacarídeos neutros da fração total da parede celular da parte
aérea e do sistema radicular plântulas de cana-de-açúcar com 28 dias de tratamento em meio sem
sacarose e meio MS
Figura 11. Mecanismos de controle das relações fonte-dreno para o transporte de sacarose na
planta
Figura 12. Via de biossintese das giberelinas a partir do GGDP e sua desativação pela GA2-
oxidase
Figura 13. Localização de algumas enzimas que participam do metabolismo das GAs
Figura 14. Representação da estrutura química do paclobutrazol
Figura 15. Perfil de eluição de açúcares solúveis totais em coluna cromatográfica Carbopac PA1
por HPAEC
Figura 16. Perfil de eluição de monossacarídeos neutros em coluna cromatográfica Carbopac
PA1 por HPAEC
Figura 17. Esquema das principais etapas da extração de acúcares solúveis e monossacarídeos
Figura 18. Análise dos RNAs totais de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas in vitro por 21 dias
em meio MS (controle), na presença de GA ₃ 0,5 mg.L ⁻¹ e PBZ 0,05mg.L ⁻¹
Figura 19. Variação de resposta dos genes eEF 1a, ATP, 60S, UBQ10, Act 11 e UB ao cultivo
in vitro em meio MS, $GA_3 0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ e PBZ 0.05 mg.L^{-1}
Figura 20. Curva de dissociação do gene da Ubiquitina (UB), mostrando apenas um pico de
amplificação, o que sugere especificidade
Figura 21. Teores de sacarose da parte aérea de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas in vitro
submetidas a diferentes concentrações de GA ₃ ao longo de 28 dias de tratamento
Figura 22. Razão entre sacarose/monossacarídeos(frutose e glucose) em plântulas de cana-de-
açúcar cultivadas in vitro em meio MS submetidas a diferentes concentrações de GA ₃ 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo das principais características em relação a composição da parede celular tipo I
e II14
Tabela 2. Concentração de Sacarose na parte aérea de plântulas de cana-de-açúcar em diferentes
horários de coleta em meio de cultura contendo sacarose (MS) e sem adição de sacarose (SS)
Tabela 3. Teores de açúcares solúveis totais e redutores da parte aérea de plântulas de cana-de-
açúcar cultivadas in vitro submetidas a diferentes concentrações de GA ₃ 91
Tabela 4. Alometria de plântulas de cana-de-açúcar coletadas em diferentes intervalos de tempo,
cultivadas in vitro em meio MS, na presença de PBZ 0.05 mg.L^{-1} e diferentes concentrações de
GA ₃ 95
Tabela 5. Média do comprimento e largura das células de plântulas de cana-de-açúcar com
7 dias de tratamento
Tabela 6A. Genes relacionados com a biossintese hormonal e via de transdução de sinais104
Tabela 6B. Fatores de transcrição 105
Tabela 6C. Genes relacionados com o ciclo celular .106
Tabela 6D. Genes relacionados com a parede celular
Tabela 6E. Genes relacionados com a fotossíntese 107
Tabela 6F. Genes relacionados com o metabolismo de carboidratos 108
Tabela 6G. Genes relacionados com diversas funções que influenciam o metabolismo de
carboidratos

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Lista com sequências dos primers dos normalizadores	182
Anexo 2. Lista com sequências dos primers do genes	
Anexo 3. Alinhamento da sequência de aminoácidos de normalizadores que foram rea	alizadas no
clustal w	185
Anexo 4. Alinhamento da sequência de aminoácidos de normalizadores que foram rea	alizadas no
clustal w	
Anexo 5. Alinhamento da sequência de aminoácidos de normalizadores que foram rea	alizadas no
clustal w	187
Anexo 6. Catálago dos genes validados por qRT-PCR com suas características e	respectivas
funções	189
Anexo 7. Tabela da composição dos monossacarídeos neutros da fração total da par	ede celular
de plântulas de cana-de-açúcar	223
Referências bibliográficas do anexo 6	225

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Histórico e importância econômica da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea que pertence à família Poaceae, da classe das Liliopsida, representante da Ordem Cyperales. Esta ordem caracteriza-se por apresentar flores pequenas, sem perianto e protegidas por brácteas secas, reunidas em inflorescências (espiga). O fruto é seco do tipo cariopse e com semente que possui endosperma abundante. O caule é um colmo com nós e entrenós (ocos ou cheios). *Saccharum* sp. são plantas eretas, perenes e rizomatosas, produzindo inflorescências formadas por racemos arranjados em grandes panículas (PARANHOS, 1987). Acredita-se que as espécies desse gênero que deram origem a cana-de-açúcar tiveram origem no Sudeste Asiático há cerca de 6.000 anos a.C. (DANIEL & ROACH, 1987). Desde então, a cana-de-açúcar vem se disseminando pelo mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à tribo Andropogoneae, da família Gramineae (Poaceae). Pertence ao gênero *Saccharum* formado por híbridos (ARCENEAU, 1968; PRINCE 1965) derivados de *Saccharum officinarum*, *S. sinense*, *S. barbieri* e *S. spontaneum* (ROACH, 1972). As variedades cultiváveis atuais são altamente poliplóides e, na média, apresentam de 100-120 cromossomos, podendo este número variar entre os cultivares comerciais. Estes, por sua vez, são resultado de hibridação interespecífica entre as espécies *S. officinarum*, que contribui com alto teor de açúcar e *S. spontaneum*, responsável pelo vigor vegetativo e resistência a estresses bióticos e abióticos (MING et al, 1998).

Devido à extraordinária capacidade de estocar sacarose nos entrenós, a cana-de-açúcar transformou-se em uma importante fonte de energia para o homem e, consequentemente, tornando-se um alvo prioritário para o melhoramento genético (MOORE, 2005).

1

A partir da sacarose acumulada no colmo da cana-de-açúcar é possível produzir o açúcar (sacarose) e o álcool (etanol), produtos estes amplamente utilizados pela população mundial e cuja demanda vem crescendo rapidamente nos últimos anos. Assim, a cana-de-açúcar vem gradativamente se destacando como uma das mais importantes espécies vegetais cultivadas pelo homem, contribuindo atualmente com cerca de 65% de todo o açúcar produzido (INGELBRECHT et al, 1999).

Historicamente, a agroindústria da cana-de-açúcar contribuiu de forma marcante não apenas na economia do país, mas também para outros setores: 1) social- através da geração de empregos no campo e nas cidades, 2) estratégico- representando uma alternativa ao petróleo para a geração de energia e 3) ambiental- servindo de matéria-prima para a produção de álcool combustível, menos poluente do que a gasolina.

O bagaço da cana também é de grande interesse para o setor energético, podendo ser utilizado na co-geração de energia elétrica. As fibras podem ainda servir de matéria-prima para diversos produtos como papel, chapas aglomeradas, ração animal, etc. O bagaço e palha da cana são fonte de açúcares fermentáveis e há intensa atividade de pesquisa para tornar viável a produção de bioetanol (ou etanol celulósico).

A cana-de-açúcar é cultivada em várias regiões do mundo, podendo-se destacar como mais importantes os países do continente americano, africano e asiático, totalizando cerca de 121 países produtores (Figura 1).

2



Figura 1. Distribuição do cultivo da cana-de-açúcar no mundo (http://www.sugarcanecrops.com/)

No Brasil, a cultura se adaptou muito bem às condições climáticas, ocupando diferentes regiões do território nacional, estabelecendo-se principalmente nas regiões Centro-Sul e Nordeste (CARVALHO, 1993) (Figura 2). Atualmente, dentre os países que cultivam a cana-de-açúcar, o Brasil ocupa posição de destaque, com a cana ocupando cerca de 7 milhões de hectares, o que significa aproximadamente 2% de toda terra arável do País. Esta produção contribui com 34% de toda a produção mundial, seguida pela Índia, Tailândia e Austrália. Neste começo do século, o Brasil se consolidou como o maior produtor mundial de açúcar de cana e a produção de cana-de-açúcar para o ano de 2008 foi de cerca de 588 milhões de toneladas, quantidade 13,9 % maior que a de 2007. É esperado para 2009 uma produção 16% maior que a de 2008 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE).



Figura 2. Mapeamento do plantio da cana-de-açúcar no Brasil (http://www.unica.com.br).

O estado de São Paulo é responsável por 60% da safra brasileira (PESSOA-Jr et al, 2005).

Dada a importância mencionada do setor sucroalcooleiro na economia nacional e a demanda global para os próximos anos, do álcool principalmente, investimentos e pesquisas são necessários para atender os desafios que o setor enfrentará para continuar crescendo às taxas atuais, mantendo acima de tudo, sua liderança mundial. Nesse contexto, o emprego de ferramentas de biotecnologia para a compreensão e domínio do metabolismo, no desenvolvimento e melhoramento genético são de suma importância para acelerar a obtenção de variedades mais produtivas e/ou eficientes, visando reduzir insumos, custos e impactos ao meio

ambiente. Devido à sua origem interespecífica, a cana-de-açúcar possui um dos mais complexos genomas vegetais, apresentando níveis variáveis de ploidia e aneuploidia. A identificação de genes responsáveis por qualidades agronomicamente desejáveis e sua posterior manipulação por meio de técnicas de biologia molecular são passos importantes para a obtenção de variedades melhor adaptadas às condições climáticas variáveis. Além disso, devido aos altos níveis de similaridade genética entre gramíneas (GUIMARÃES et al, 1997), os estudos realizados em cana-de-açúcar podem ser extrapolados para outras gramíneas cultivadas, auxiliando assim a desenvolver a biotecnologia para gramíneas em geral tanto no campo da bioenergia como em alimentos e outros setores.

1.2 Fotossíntese em plantas C₄

O primeiro passo para a descoberta de HATCH & SLACK em 1966 do ciclo C₄ foi a observação de um alto conteúdo de ácido málico e aspártico em folhas de cana-de-açúcar após a fotossíntese, feita em 1950 por pesquisadores do Havaí. Sendo assim, a cana-de-açúcar fixa o CO_2 em um ácido orgânico de 4 carbonos (malato) nas células do mesófilo das folhas. O malato é então transportado para as células da bainha, onde é descarboxilado; o CO_2 liberado é fixado em sacarose via Ciclo de Calvin (NELSON & COX, 2000).

Um dos aspectos que evidencia a diversidade fisiológica na família Poaceae é a presença dessa via alternativa de fotossíntese, a via C_4 ou o ciclo de Hatch-Slack. Esta via metabólica está associada à ocorrência de anatomia foliar do tipo "Kranz", onde a bainha vascular possui células radialmente dispostas e ricas em cloroplastos (Figura 3A).

A via de fotossíntese C_4 é referida como muito eficiente, principalmente em plantas de ambientes com alta irradiância e temperatura (PEARCY & EHLERINGER, 1984). Nessas condições há maior produção de biomassa, quando comparada às plantas com metabolismo fotossintético C_3 além da utilização mais eficiente de água e CO_2 (SALISBURRY & ROSS, 1991) (Figura 3B). Por essa razão, essas espécies com metabolismo fotossintético do tipo C_4 ocorrem abundantemente em savanas tropicais e vegetações arbustivas de regiões semiáridas.



Figura 3A. Anatomia Kranz de folhas de plantas C₄(TAIZ & ZEIGER, 2004)





A via metabólica de síntese de sacarose em plantas C4 é praticamente a mesma para plantas C₃, sendo que o modelo proposto por GLASZIOU & GAYLER (1972) para o acúmulo de sacarose ainda é o que melhor descreve esse processo. Nele, a trioseP exportada para o cloroplasto é convertida para frutose-1,6-bifosfato (Fru1,6P2) pela enzima aldolase e subseqüentemente hidrolisada para frutose-6-fosfato (Frut6P) pela enzima citosólica frutose-1,6bifosfatase (F1,6BPase). Este último passo, irreversível, é considerado como sendo um importante ponto de controle (LUNN & FURBANK, 1999). A Frut6P é então convertida para glucose 6-fosfato (Glc6P), glucose 1-fosfato e finalmente para UDP-glucose via UDPGlcpirofosforilase. A síntese da sacarose é controlada pela atividade da sacarose fosfato sintase (SPS) (EC 2.4.1.14) que catalisa a reação UDP-glucose + Frut6P => UDP + sacarose 6-fosfato (Suc6P), sendo posteriormente hidrolisada pela sacarose fosfato fosfatase (SPP) (EC 3.1.3.24). Esta última reação, que também é irreversível, gera sacarose, que será translocada para os tecidos dreno e fosfato inorgânico (Pi), que retornará ao cloroplasto via translocador de fosfato para o contínuo suprimento de trioseP para o citosol. A sacarose produzida nas folhas é transferida para o floema e transportada até os entrenós, onde é armazenada. Por outro lado, a clivagem da sacarose é catalisada por duas enzimas: a invertase (EC 3.2.1.26) e a sacarose sintase (EC 2.4.1.13). A invertase é uma hidrolase que cliva a sacarose em dois monossacarídeos: glucose e frutose (através da reação: sacarose + H2O => glucose + frutose). Há várias isoformas de invertase com diferentes propriedades bioquímicas que podem acumular-se no citoplasma (invertase neutra), no vacúolo (invertase ácida) e no espaço extracelular (invertase da parede celular). A sacarose sintase (SS) é uma glicosiltransferase que, na presença de UDP, converte a sacarose em UDP-glucose e frutose. Embora exista certa controvérsia a respeito de uma possível

atividade de síntese da sacarose pela SS, a maior parte das evidências demonstra que essa enzima poderia ser responsável pela clivagem da sacarose (BOTHA & BLACK, 2000).

Desde 1960 vários grupos tentam elucidar os fatores determinantes no acúmulo de sacarose, apresentando resultados muitas vezes conflitantes. Na década de 60, a enzima invertase ácida solúvel (SAI) era identificada como a principal responsável na regulação do acúmulo de sacarose. Pesquisas mais recentes apontam outras enzimas, tais como a SS ou um balanço de atividade entre diversas enzimas como responsáveis na regulação do acúmulo de sacarose. Nenhum desses estudos pode ser considerado conclusivo, uma vez que as comparações foram feitas entre condições ambientais divergentes, envolvendo diferentes germoplasmas e tecidos das plantas. Baseado em resultados obtidos por análise de níveis enzimáticos e quantidade de açúcar em várias progênies de cana-de-açúcar, concluiu-se que o conteúdo de sacarose está fortemente correlacionado com as atividades de SPS e SAI, propondo-se que o acúmulo de sacarose só é possível quando a atividade de SPS excede a da SAI (BOTHA & BLACK, 2000). Porém, a diminuição da atividade da SAI nem sempre é evidente durante o processo de acúmulo de sacarose tornando incerta a proposta do acúmulo de sacarose ser causado pela sua redução (EBRAHIM et al., 1999). Também são divergentes os resultados obtidos com a enzima SS que também parece possuir atividade de síntese, apesar de sua principal atividade ser a de clivagem de sacarose. Em um estudo feito entre genótipos de uma população F1 segregante, ZHU et al (1997) e BOTHA & BLACK (2000) não encontraram correlação significativa entre a atividade da enzima SS e o acúmulo de sacarose, resultado distinto do observado em diversos estudos e que relacionam positivamente o aumento de seus níveis com a taxa de acúmulo de sacarose e de maturação (LINGLE & IRVINE, 1994; LINGLE, 1997). WHITTHAKER & BOTHA (1999) estudaram a atividade da enzima fosfofrutoquinase pirofosfatodependente (PFP), que catalisa a conversão de frutose 6-fosfato e pirofosfato para frutose 1,6- bifosfato e fosfato inorgânico. Foi observada uma correlação inversa com o conteúdo de sacarose em diversas variedades comerciais de cana-de-açúcar e também em uma população F1 segregante. Em estudos mais recentes, CASU e colaboradores (2003) obtiveram dados interessantes no perfil de expressão gênica analisado por arranjos de DNA. Por exemplo, transcritos de enzimas envolvidas na síntese e clivagem de sacarose, tais como SPS e SS, foram significativamente reprimidos em tecidos de entrenó maduro, assim como transcritos para 3 enzimas regulatórias, tais como frutose-2,6-bifosfato, PFP e fosfoglicomutase. Todos esses dados nos levam a concluir o quão complexa é a regulação da síntese de carboidratos em cana-de-açúcar e que será necessário um aprofundamento ainda maior em estudos sobre o metabolismo de carbono se quisermos entender como a cana controla seu nível endógeno de sacarose.

1.2.1 Metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar devido a sua capacidade de produzir e acumular sacarose é uma das monocotiledôneas de maior importância econômica no mundo. O entrenó maduro pode acumular 12 - 16% de seu peso fresco e cerca de 50% de seu peso seco em sacarose (BULL & GLASZIOU, 1963, citado por CASU et al, 2003). Desta maneira, o aumento da concentração de sacarose em plantas de cana-de-açúcar vem sendo objeto de estudo há várias décadas. Porém, pouco se sabe sobre os determinantes fisiológicos e genéticos responsáveis pelo seu acúmulo.

O metabolismo de carboidratos nas folhas sofre profundas alterações durante o desenvolvimento da planta. As folhas jovens são heterotróficas, pois dependem de carboidrato importado de outras regiões da planta. As folhas adultas, por outro lado, são autotróficas, ou seja, elas produzem fotoassimilados e atuam como a maior fonte de transporte de açúcar. Essa

conversão de dreno para fonte acarreta em várias mudanças fisiológicas na folha, que podem ser responsáveis pela capacidade de acumular sacarose nos entrenós, especialmente nos vacúolos.

1.3 Parede celular: aspectos gerais

A parede celular é uma estrutura muito dinâmica e complexa e está relacionada a diversos processos, como dar forma e tamanho às células, conferir resistência mecânica aos tecidos, controlar a expansão celular, atuar sobre o transporte intercelular, participar da sinalização e do reconhecimento entre células, armazenar compostos de reserva e moléculas reguladoras e sinalizadoras que controlam diversos processos fisiológicos celulares, além de participar dos mecanismos de proteção contra microorganismos (DARVILL *et al.*, 1992, ALDINGTON & FRY, 1993).

A composição dos monossacarídeos da parede é relativamente constante (FRY 1988; BRETT & WALDRON, 1996). Eles são organizados em polissacarídeos como a celulose, que é o principal composto das paredes celulares de plantas superiores. A celulose é um polímero linear constituído por unidades de glucose, unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β - $(1\rightarrow 4)$. As hemiceluloses são polímeros que interagem fortemente com a celulose. Dentre elas, as mais comumente encontradas são os mananos, na maioria das vezes em tecidos de reserva, e xiloglucanos, em paredes celulares primárias e também em tecidos de reserva. Os xiloglucanos são polissacarídeos de reserva ou de parede primária (a parede que se forma logo após a divisão celular e ainda não se diferenciou em outro tipo de parede como as de tecidos vasculares ou de reserva), e assim como a celulose, apresentam cadeia principal composta de glucoses unidas entre si por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4), ramificada com ligações α -(1 \rightarrow 6) por resíduos de xilose, ou ainda oligossacarídeos que contêm uma galactose ligada à xilose. Os xiloglucanos de parede primária podem apresentar também resíduos de fucose ligados a uma das galactoses. Porém, a fucosilação não ocorre no polissacarídeo de reserva (BUCKERIDGE et al., 2000). O xiloglucano apresenta ramificações em pontos específicos com a xilose α -(1 \rightarrow 6), a qual se liga com a galactose β -(1 \rightarrow 2), e algumas galactoses no caso da parede primária estão ligadas à fucose através de ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 6). As ramificações com xilose são regulares, sendo que na maioria dos xiloglucanos uma a cada quatro ou cinco glucoses não apresenta ramificações (BUCKERIDGE et al., 2008). Os mananos puros são polímeros constituídos por manoses, unidos através de ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4). Os mananos podem ser classificados como os galactomananos, que possuem ramificações de galactose, ligadas à cadeia principal através de ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 6), ou ainda os galactoglucomananos, que possuem a cadeia principal formada por manoses intercaladas com glucose (geralmente duas moléculas de glucose para uma de manose), ligadas através de ligações glicosídicas do tipo β - $(1\rightarrow 4)$, e ramificações de galactose com ligações glicosídicas do tipo α - $(1\rightarrow 6)$. Os glucuronoarabinoxilanos (GAX) são polímeros ácidos e possuem uma cadeia de xiloses unidas por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4), ramificados com arabinose e com ácido galacturônico. São característicos de monocotiledôneas e aparecem também na parede celular de tecido vascular (xilema) (BUCKERIDGE el al, 2008). Outro grupo de polissacarídeos da parede celular é o das pectinas, que é constituído de polímeros menos fortemente ligados à parede que as hemiceluloses e têm um caráter ácido. Além desses polissacarídeos, a parede celular possui aproximadamente 10% de sua massa na forma de proteínas, que podem ter a função estrutural (expansina, por exemplo) ou enzimática e estão relacionadas com o metabolismo de polissacarídeos.

CARPITA & GIBEAUT (1993) propuseram que no reino vegetal as paredes poderiam ser divididas em Tipos I e II. A divisão proposta nesse artigo foi baseada principalmente na composição de hemiceluloses e na proporção entre as matrizes. Na parede Tipo I o xiloglucano é a principal hemicelulose e as proporções de celulose, hemicelulose e pectinas seriam de aproximadamente 30% cada, com cerca de 10% de proteínas. A parede do Tipo II seria a parede característica das Poaceae, que veremos a seguir.

1.3.1 Parede celular de Gramíneas

Um modelo que diferencia a composição química de parede celular de Dicotiledôneas e Monocotiledôneas foi proposto há mais de 20 anos (DARVILL et al., 1980). Talvez pela grande importância econômica dos cereais, a maioria das monocotiledôneas estudadas foi de gramíneas (CARPITA, 1996). Segundo CARPITA & GIBEAUT (1993) gramíneas e cereais apresentam parede do tipo II (Figura 4). Nas gramíneas os glucuronoarabinoxilanos (GAXs) contituem a hemicelulose principal, apresentando ligações com ácidos ferúlicos que interagem com as microfibrilas de celulose, formando o domínio celulose-hemicelulose da parede celular (BUCKERIDGE et al., 2004). Esses polissacarídeos são constituídos por uma cadeia carbônica principal de resíduos de xilose β -(1,4) com ramificações de arabinose através de ligações α -(1,2) e/ou α - (1,3), e de ácido glucurônico através de ligação α - (1,6) (figura 5). Os GAXs, em conjunto com a celulose e os β -glucanos, constituem o arcabouço das paredes celulares das gramíneas, formando parte do esqueleto da parede, o qual mantém a integridade do tecido (FINCHER et al, 1986).

Aparentemente, os GAXs surgiram ao longo da evolução em monocotiledôneas como provável substituto do xiloglucano na função de alinhamento das microfibrilas de celulose (BUCKERIDGE et al., 2004). Enquanto os GAXs correspondem a 70% do total da parede, as pectinas não ultrapassam 5%. Em função disso, tem sido proposto que os GAXs compartilham com as pectinas a função de porosidade e também a manutenção de um ambiente iônico na parede celular (BUCKERIDGE et al., 2004), bem como a inibição intercelular de formação de gelo, principalmente nas culturas de inverno (KINDEL et al., 1989).



Figura 4 – Modelo de organização estrutural de paredes celulares encontradas em gramíneas, ilustrando seus principais componentes (CARPITA & GIBEAUT, 1993). GAX: glucuronoarabinoxilano, RG – I: rammogalacturonano I.



Figura 5 – Glucuronoarabinoxilano presente em gramíneas e na maioria das Comelinóides (BUCHNAN et al., 2000).

Outra característica muito importante das gramíneas, e de outras Poales (*sensu* DAHLGREN, 1985), adquirida ao longo da evolução, é a presença de β -glucanos, um polímero linear formado por resíduos de glucoses ligadas entre si por ligações β -(1,3) e β -(1,4).

Os β -glucanos são abundantes em paredes celulares de células endospérmicas de sementes de gramíneas, podendo compor 70% desses tecidos (FINCHER & STONE, 1986). Em plântulas de milho, por exemplo, a quantidade β -glucanos aumenta durante a expansão dos coleóptiles e das folhas (CARPITA, 1984) e decresce quando o crescimento cessa (CARPITA & KANABUS, 1998). Em células meristemáticas este polímero é raro, mas em paredes de células em alongamento aparecem em grandes quantidades, coincidindo com a razão máxima de alongamento (KIM et al, 2000).

Na tabela 1 temos um resumo das principais características da parede tipo I e do tipo II.

Tabela 1: Resumo de acordo com CARPITA & GIBEAUT (1993) das principais características em relação a composição da parede celular do tipo I e II.

Constituição	PAREDE TIPO I (dicotiledôneas)	PAREDE TIPO II (monocotiledôneas)
Principal hemicelulose	Xiloglucano (até 30%)	Glucoranoarabinoxilano (GAX), β-
		glucano (até 80%)
Celulose	até 30%	até 20%
Pectina	até 30%	até 5%
Proteínas	até 10%	até 8%

LIMA et al. (2001) encontraram 469 genes (ESTs expressos) relacionados à parede celular em cana. O padrão de expressão foi consistente com a parede celular do tipo II. Em 2003, SILVA reportou a composição e estrutura dos mesmos tecidos utilizados para a realização do

projeto EST (SUCEST-FAPESP) e demonstrou que a parede da cana é formada por arabinoxilanos e β -glucanos como principais hemiceluloses, mas contando também com pequena proporção de mananos e pectinas.

1.4 Germinação de sementes in vitro

As primeiras técnicas de cultivo *in vitro* surgiram no início do século XX. Diversas experiências foram realizadas em diferentes países do mundo. Muitas fontes vegetais, diversos meios de cultura e condições ambientais foram testadas sem que houvesse uma definição de um protocolo único para todas as espécies, fato este devido às diferentes necessidades de cada planta, com relação a nutrientes, fotoperíodo, fisiologia, etc. (TORRES et al., 1998).

A propagação de muitas espécies, normalmente ocorre através de sementes (RIBAS et al., 2005), e uma das maiores dificuldades nessas condições no estabelecimento do cultivo *in vitro* está na obtenção de tecidos livres de contaminação (BIANCHI et al., 2003), tendo em vista que as sementes permanecem um bom período no campo, estando dessa forma mais susceptíveis aos microorganismos (bactérias, fungos, entre outros). Em função disso, são rotineiramente contaminadas tanto interna como externamente por patógenos que são difíceis de controlar, sendo que a desinfestação e desinfecção podem causar danos aos tecidos ou mesmo levá-los à morte (ANDRADE et al., 2000).

Segundo CID (2006) a assepsia é entendida como um conjunto de técnicas para tornar um explante ou qualquer parte da planta livre de microorganismos. Para o autor, na obtenção de material vegetal livre de contaminantes é inevitável a utilização de antissépticos, sejam estes bacteriostáticos (inibem o crescimento de bactérias nas fases iniciais do cultivo) ou germicidas, associada a uma manipulação correta dos explantes em ambiente axênico (livre de

contaminantes). Existem diversas substâncias que podem ser utilizadas para a assepsia do material vegetal, dentre estas podemos citar: os antibióticos, alcoóis (etanol), halogênicos (hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio), sais de metais pesados (cloreto de mercúrio) e fungicidas orgânicos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; CID, 2006). Os agentes desinfestantes podem ser utilizados de maneira associada ou não, para uma maior eficiência do protocolo de desinfestação. A concentração da solução, a combinação dos princípios ativos e o tempo de exposição podem variar muito (MONTARROYOS, 2000; CHAVES et al, 2005), fazendo-se necessária, portanto, a definição de um protocolo eficiente de desinfestação de acordo com a espécie e com a sensibilidade do tecido a ser desinfestado.

1.4.1 Constituição do meio de cultura

De modo geral, o cultivo *in vitro* de plantas é influenciado pelo meio nutritivo, tipos e condições fisiológicas do material vegetal, genótipos, condições de cultivo e pelos fitorreguladores.

Os meios de cultivo podem variar sua composição, mas em geral, possuem grande quantidade de macro e micronutrientes em diferentes proporções, responsáveis pelo crescimento da planta como um todo, carboidratos como fonte de carbono (sacarose, glucose, maltose), devido a baixa capacidade fotossintética das plantas na propagação *in vitro* (COHEN, 1995), vitaminas (tiamina, piridoxina e ácido ascórbico), além de inositol e sorbitol (DAMIÃO FILHO, 1995; HU & FERREIRA, 1998). O pH da maioria dos meios de cultura é ajustado entre 5,5 e 6,0 (CALDAS & BUSO, 1998).

O meio de cultura, além de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento (TORRES et al.,1998), também controla o padrão de desenvolvimento *in vitro*, devido às

16

diferentes respostas do material vegetal frente às combinações hormonais e condições de cultivo. Em geral, durante o desenvolvimento da cultura, vários ensaios devem ser conduzidos inicialmente no sentido de determinar as melhores condições de cultivo (TIWARI et al., 2001; VENKATAIAH et al., 2003).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDINGTON, S. & FRY, S. C., 1993. Oligosaccharins. Advances in Botanical Research. Elsevier, London, 101p.
- ANDRADE, M. W. de; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. & MELO, P. R. A., 2000. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva*). Ciên. Agrot. 24: 174-180.
- ARCENEAU,G., 1968. Evaluation and timely utilization of sugarcane varieties. Sugar Journal. vol: 31(3):18-&
- BIANCHI, V. J.; CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W. & FACHINELLO, J. C., 2003. Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em hipoclorito de sódio. Rev. Bras. Agro. 9:(2): 177-179.
- BOTHA, F. C. & BLACK, K. G., 2000. Sucrose phosphate synthase and sucrose synthase activity during maturation of internodal tissue in sugarcane Aust. J. Plant Physiol. 27: 81-85.
- BRETT, C. T. & WALDRON, K. W., 1996. Physiology and Biochemistry of plant cell walls, 2nd ed. Chapman and Hall, London.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W. & JONES, R.L., 2000. Biochemistry & molecular biology of plants. Am. Soc. Plant Physiol., Rockville
- BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A. S.; SANTOS, H. P. & LIMA, D. U., 2000. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. Rev. Bras. Fisio. Veg. 12: 137-162.
- BUCKERIDGE, M. S.; RAYON, C.; URBANOWICZ, B.; TINÉ, M. A. S & CARPITA, N. C., 2004. Mixed linkage (1-3),(1-4)-beta-D-glucans of grasses Cereal. Chemistry, 81: 115-127.
- BUCKERIDGE, M. S.; CAVALARI, A. A. & SILVA, G. B., 2008. Parede Celular. In: Fisiologia Vegetal, Gilberto B. Kerbauy (Ed.). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. Cap. 9: 165-181.
- BULL, T. A. & GLASZIOU, K. T. 1963. The evolutionary significance of sugar accumulation in Saccharum. Aust J. Biol. Sci. 16: 737-742.

- CALDAS, L. S. & BUSO, J. A., 1998. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília. Ed. EMBRAPA/CNPH, 260p.
- CARPITA, N. C., 1984. Cell wall development in maize coleoptiles. Plant Physiol., 76: 205-212.
- CARPITA, N. C. & GIBEAUT, D. M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the cell wall during growth. Plant J. 3: 1-30.
- CARPITA N.C. 1996. Structure and Biogenesis of the cell walls of grasses. Ann. Ver. Plant Physiol. and Mol. Plant Biol. 47: 445-476.
- CARPITA, N. C. & KANABUS, J., 1988. Chemical structure of the cell walls of dwarf maize and changes mediated by gibberelin. Plant Physiol. 88: 671-678.
- CARVALHO, L. C. C., 1993. Perspectivas da cultura da cana-de-açúcar para a década de noventa. In Camara GMS, Oliveira EAM (ed) Produção de cana-de-açúcar. Piracicaba FEALQ, 1-17.
- CASU, R. E.; GROF, C. P. L.; RAE, A. L.; McINTYER, C. L.; DIMMONCK, C. M. & MANNERS, J. M., 2003. Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. Pl Mol Biol 52, 371-386.
- CHAPMAN, G. P., 1996. The biology of grasses. CAB. International, Wallingford, 288 p.
- CID, L. P. B., 2006. A propagação in vitro de plantas. O que é isso? Cultura de tecidos vegetais
 uma ferramenta no estudo da biologia moderna de plantas. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Disponível em:<http://www.biotecnologia.com.br/>
- CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W. & ERIG, A. C., 2005. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. Ciên. Agrotéc. 29 (6): 1281-1287.
- COHEN, D., 1995. The culture medium. Act. Hortic. 193: 15-24.
- DAHLGREN, R., CLIFFORD, H. T. & YEO, P. F., 1985. The families of monocotyledons. Springer Verlag, Berlin.
- DAMIÃO FILHO, C. F., 1995. Cultura de Tecidos de Plantas: micropropagação. Jaboticabal, SP:FUNEP, 25p.
- DANIEL, J. & ROACH, B. T., 1987. Taxonomy and evolution. In Heiz, DJ (Ed). Sugarcane improvement throught breeding. Elsevier, Amesterdam. p. 7-84.
- DARVILL, A.; McNEIL, M.; ALBERSHEIM, P. & DELMER, D. P., 1980. The primary cell walls of flowering plants. In: P.K. Strumpf & E.E. Conn (Eds). The biochemistry of plants: a compehensive treatise. Academic Press, New York. p. 91-162.
- DARVILL, A. G.; AUGUR, C.; BERGMANN, C.; CARLSON, R. W.; CHEONG, J. J.;
 EBEHARD, S.; HAHN, M. G.; LÓ, V. M.; MARFÁ, V.; MEYER, B.; MOHNEN, D.;
 O'NEILL, M. A.; SPIRO, M. .D.; VAN HALBEEK, H.; YORK, W. S. & ALBERSHEIM, P., 1992. Oligosaccharins oligosaccharides that regulate growth, development, and defense responses in plants. Glycobiology, 2:181-198.
- EBRAHIM, M. K. H.; ZINGSHEIM, O.; VEITH, R.; ABO-KASSEM, E. E. M. & KOMOR, E., 1999. Sugar uptake and storage by sugarcane suspension cells at different temperatures and high sugar concentrations. J. Plant Physiol. 154: 610-616.
- FINCHER, G. B; LOCK, P. A; MORGAN, M. M.; et al., 1986. PRIMARY STRUCTURE OF THE (1-]3,1-]4)-BETA-D-GLUCAN 4-GLUCANOHYDROLASE FROM BARLEY ALEURONE. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA Vol.83(7): 2081-2085.
- FRY, S. C., 1988. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Longman, New York.
- GLASZIOU, K. T. & GAYLER, K. R., 1972. Sugar accumulation in sugarcane role of cellwalls in sucrose transport. Plant Physiol. 49: 912.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A., 1998. Micropropagação. In: TORRES, A.C., HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES A.C.; CALDAS L.S.; BUSO, J.A. (eds.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 533-568.
- GUIMARAES, C. T.; SILLUS, G. R. & SOBRAL, B. W. S., 1997. Comparative mapping of andropogoneae: *Saccharum* L (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 14261-6.
- HATCH, M. D & SLACK, C. R., 1966. Photosynthesis in sugarcane leaves: a new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. Biochem J. 101: 103–111.

- HU, C. Y. & FERREIRA, A. G., 1998. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.
 S.; BUSO, J. A. (Eds.).Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas. Brasília: EMBRAPA-CBAB, p. 371-394.
- INGELBRECHT, I. L; IRVINE, J. E. & MIRKOV, T. E., 1999.Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. Plant Physiol. vol. 119(4): 1187-1197.
- KELLOG, E. A., 1998. Relationships of cereal crops and other grasses. Proc. Nat. Acad. Sci. 95: 2005-2010.
- KIM, J. B.; OLEK, A. T. & CARPITA, N. C., 2000. Plasma membrane and cell wall exo-β-Dglucanases in developing maize coleoptiles. Plant Physiol. 123: 471-485.
- KINDEL, P. K; LIAO, S. Y; LISKE, M.R; et al., 1989. ARABINOXYLANS FROM RYE AND WHEAT SEED THAT INTERACT WITH ICE. CARBOHYDRATE RESEARCH, Vol.187(2):173-185
- LINGLE, S. E., 1997. Seasonal internode development and sugar metabolism in sugarcane.

Crop Science 37: 222-1227

- LINGLE, S. E. & IRVINE, J. E., 1994. Sucrose synthase and natural ripening in sugarcane CropScience 34:1279-1283
- LUNN, J. E. & FURBANK, R. T., 1999. Sucrose biosynthesis in C-4 plants. New Phytol. 143: 221-237.
- MING, R.; LIU, S. C.; MOORE, P. H.; IRVINE, J. E. & PATERSON, A. H., 1998. QTL analysis in a complex autopolyploid: Genetic control of sugar content in sugarcane. Gen. Res. 11: 2075-2084.
- MONTARROYOS, A. V. V., 2000. Contaminação in vitro. ABCTP Notícias, 36 e 37: 5-10.
- MOORE, P. H., 2005. Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: towards developing an understanding of the gene-to-crop continuum. Field Crops Res. 92: 119-135.

- NELSON, D. L & COX, M. M., 2000. Principles of Biochemistry Worth Publishers, New York Nogueira FTS, De Rosa VE, Menossi M, Ulian EC, Arruda, P. 2003. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. Plant Physiol 132:1811-1824
- PARANHOS, S. B., 1987. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill. V.1, p. 431.
- PEARCY, R. W. & EHLERINGER, J., 1984. Comparative ecophysiology of C3 and C4 plants. Plant Cell Environ. 7: 1-13.
- PESSOA JÚNIOR, A.; ROBERTO, I. C.; MENOSSI, M.; SANTOS, R. R; ORTEGA FILHO, S.& PENNA, T. C. V., 2005. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. App Bioch Biotech 121: 59-70.
- PRICE, S., 1965. Interespecific hybridization in sugarcane breeding. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Techn. 12: 1021-1026.
- RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L. & GUERRA, M. P., 2005. Micropropagação de Aspidosperma lolyneuron (Peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de plântulas juvenis. Rev. Arv. 29 (4): 517-524.
- ROACH, B. T., 1972. Mobilisation of sugarcane. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Techn. 14: 206-216.
- SALISBURY, F. B. & ROSS, C. W., 1991. Plant physiology. 4 ed. Belmont: Wadsworth. 682p.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E., 2004. Fisiologia Vegetal. 3 ed., Porto Alegre: Artmed Editora.719p.
- TIWARI, V.; TIWARI, K. N. & SINGH, B. D., 2001. Comparative studies of cytokinin *in vitro* propagation of *Bacopa monniera*. Plant Cell 66: 9-16.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A., 1998. Cultura de Tecidos *in vitro* e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 2: 183- 260.
- VENKATAIAH, P., CHRISTOPHER, T.; SUBHASH, K. 2003. Thidiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *Capsicum annuum* L. J. Plant Biotech. 5 (4): 381-432.

- WHITTAKER, A. & BOTHA , F. C. 1999. Pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase activity patterns in relation to sucrose storage across sugarcane varieties. Physiol. Plant. 107: 379-386.
- ZHU, Y. J.; ALBERT, H. & MOORE, P., 1996. Correlation of sucrose metabolism enzymes with sucrose storage in stem internodes of sugarcane. PLANT PHYSIOLOGY Vol.111(2):378-378 Supplement: Suppl. S

Parte I – Determinação das condições ótimas de cultivo e avaliação do desenvolvimento de plântulas e do metabolismo de carboidratos em cana-de-açúcar

RESUMO

A Parte I desta tese teve foco na determinação das melhores condições para obter a máxima germinação das sementes e também a obtenção de plântulas de crescimento que poderiam ser submetidos a tratamentos com giberelina A₃. As condições gerais de assepsia para a germinação de sementes e crescimento inicial da plântula foi obtida utilizando meio de cultura (Murashigue-Skoog (MS). A presença de sacarose no meio foi avaliada através da massa fresca, composição e teores de carboidratos. A fim de encontrar o melhor tempo durante o dia para extrair e analisar os hidratos de carbono, as plantas foram colhidas nos tempos 0, 6, 12 e 18 horas e submetidas a extração dos açúcares solúveis, amido e polissacarídeos da parede celular. Os teores de amido em plântulas foram próximas de zero, e foram desconsiderados. Da mesma forma, a sacarose não foi detectada nas raízes da cana, quando as plantas foram cultivadas no meio MS sem sacarose. No entanto, a sacarose foi detectada nas raízes das plântulas cultivadas com sacarose, o que sugere que este dissacarídeo pode ser absorvido durante o crescimento das plântulas, provavelmente através das raízes. A ausência de sacarose em raízes pode ser explicada pelo fato de que as raízes crescem muito pouco durante esta fase do ciclo de vida da cana. A sacarose não apresentou efeito significativo sobre nenhuma dessas variáveis durante os experimentos. Nesse sentido, não foi considerada a utilização de sacarose nos experimentos seguintes. Outro objetivo da primeira parte foi descobrir se os açúcares variam amplamente durante o dia e noite para que

os experimentos com a adição de hormônios e inibidores pudessem ser melhor planejados. Verificou-se que a maioria dos açúcares têm um discreto pico 6 horas após a germinação, especialmente quando a sacarose não é adicionada ao meio, mas essa variação não foi considerada suficientemente importante para interferir nos experimentos comparativos. Vale salientar que a amplitude de variação de concentração de açúcar em plântulas é menor na presença de sacarose, o que pode significar que o metabolismo de carboidratos parece ser controlado pelos níveis endógenos de sacarose. Esta parte da tese, assim, definiu as condições básicas do meio e o tempo de coleta que foram utilizados nos experimentos realizados com a aplicação de GA₃.

SUMARY

The Part I of this thesis had a focus on determining the best conditions to obtain maximal seed germination and also to obtain growing seedlings that could be submitted to treatments with gibberellin A_3 . The general conditions to reach aseptic seed germination and early seedling growth was obtained using Murashigue-Skoog (MS) medium. The presence of sucrose in the medium was experimentally evaluated by following fresh mass and carbohydrate contents and composition. In order to find the best time during the day to extract and analyze carbohydrates, seedlings were harvested at 0, 6, 12 and 18 hours and subjected to extraction of soluble sugars, starch and cell wall polysaccharides. The levels of starch in seedlings were near zero and we decided to consider that no starch is present in seedlings at this stage. Likewise, sucrose was not detected in sugarcane roots when seedlings were grown without sucrose. However, sucrose was detected in roots of seedlings grown with sucrose, what suggests that this disaccharide can be absorbed by the growing seedlings probably through the roots. The absence of sucrose in roots might be explained by the fact that roots indeed growth very little during this phase of sugarcane life cycle. Sucrose did not present significant effects on any of the variables followed during the experiments. On this basis, it was deemed not to use sucrose in the following experiments. Another objective of part I was to find out whether sugars would vary largely during day and night so that further experiments could be better planned. It was found that most sugars have a discrete peak at 6h after germination, especially when no sucrose is added to the medium, but this variation was not considered significant enough to interfere in the experiments. It is noteworthy that the amplitude of sugar concentration variation in seedlings is smaller in the presence of sucrose, what might mean that carbohydrate metabolism seems to be controlled by the endogenous levels of sucrose. This part of the thesis thus set up the basic conditions of medium and collection time that were used in the further experiments performed with the application of GA₃.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cultivo e desenvolvimento da cana-de-açúcar

Como a maioria das espécies de Poaceae, a cana-de-açúcar (Saccharum ssp) se desenvolve formando touceiras (SEGALLA, 1964). Na prática, a cana-de-acúcar é propagada vegetativamente por secções do colmo, denominadas toletes, contendo uma ou mais gemas. O processo de transição da gema do estado de dormência para o crescimento ativo é um fenômeno complexo, desencadeado por enzimas e regulado por hormônios de crescimento (MALAVOLTA & HAAG, 1964). A brotação da gema se inicia com o crescimento das raízes de fixação, que após o desenvolvimento das raízes verdadeiras, desintegram-se (PINTO, 1965). O sistema radicular da cana-de-açúcar pode atingir grandes profundidades, aumentando as possibilidades de sobrevivência, mesmo em períodos de deficiência hídrica. O crescimento e a distribuição das raízes variam acentuadamente com a idade da planta e podem variar também em função da freqüência de irrigação (MACHADO, 1987). O colmo que se desenvolve a partir da gema é denominado, inicialmente, de "materno" ou primário. Esta estrutura é composta por uma sucessão de entrenós em diferentes estádios fisiológicos (entrenós maduros, em maturação e imaturos). Os entrenós imaturos, que possuem crescimento intenso, estão localizados na região do colmo com folhas verdes, são fibrosos, com alta concentração de hexoses e baixa concentração de sacarose (PARANHOS, 1987). À medida que esses entrenós se desenvolvem, a taxa de crescimento diminui progressivamente e ocorre, em condições favoráveis, o armazenamento de sacarose (MACHADO, 1987). As folhas são inseridas nos nós, ocupando usualmente posições alternadas no colmo. São constituídas de duas partes: bainha (parte que sustenta e fixa a folha no colmo) e lâmina, que apresenta comprimento e largura variáveis e possui as margens serreadas (PINTO, 1965). No período inicial do desenvolvimento da cana, a

maior parcela de fotoassimilados produzidos é destinada ao crescimento das folhas (MACHADO, 1987).

Segundo VAN DILLEWIJN (1952), o crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar dependem de fatores internos e externos, sendo estes últimos especialmente elementos climáticos como precipitação, umidade do ar e temperatura.

Os ciclos de desenvolvimento da cultura estão apresentados na Figura 6, onde o primeiro ciclo representa a evolução da cana em 12 meses, chamado de cana de ano ou de cana de 12 meses. O outro ciclo representa as canas que se desenvolvem em 18 meses, sendo chamadas de cana de ano e meio ou de 18 meses (CASTRO, 1999). Após o primeiro corte, o ciclo passa a ser sempre de 12 meses para todas as variedades. A cana cultivada atualmente no Brasil constitui diversas variedades obtidas através de melhoramento genético, que conferiu à planta maior produtividade e resistência a doenças (FIGUEIREDO et al., 1995).

1.2 Plântulas como modelo de estudo

Os efeitos das giberelinas foram incialmente estudados em germinação de plântulas de cereais. Esse modelo pioneiro de estudo foi extrapolado para diversas culturas da família Poaceae, nos diversos ramos da biologia.



Figura 6. Ciclo evolutivo da cana de 12 e 18 meses, na região Centro-Sul do Brasil. fonte: ALFONSI et al. (1987).

Em nosso trabalho, foi desenhado um modelo piloto para a implementação do cultivo *in vitro* de plântulas de cana-de-açúcar, que poderá ser utilizado não só para os estudos de metabolismo de carboidratos na presença de GA₃, mas também auxiliar na compreensão de aspectos importantes do controle do desenvolvimento em geral e do metabolismo dessa cultura em particular.

Espécies da família Poaceae têm um potencial econômico gigantesco, uma vez que culturas muito importantes, como os cereais, principalmente arroz, trigo, aveia, as forrageiras e a cana-de-açúcar, as coloca em posição de destaque na alimentação humana e dos animais, além, é claro do potencial energético. Portanto, o conhecimento científico sobre a família é essencial, e aprimorar os modelos de estudo significa condicionar a compreensão do funcionamento das culturas que servem de alimento para toda a humanidade (KELLOG, 1998). O interesse econômico no cultivo de gramíneas procede do bom desempenho fotossintético, e consequentemente da produção e acúmulo de carboidratos, seja na forma de amido dos cereais,

de sacarose da cana-de-açúcar, fibras dietéticas a partir do endosperma de grãos de aveia, e também produção primária para a alimentação dos herbívoros (CHAPMAN, 1996).

2. OBJETIVOS

- Estabelecer os parâmetros para obter a germinação de sementes *in vitro*;
- Avaliar as condições de cultivo;
- Verificar as variações no metabolismo de carboidratos ao longo do dia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas sementes de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) desenvolvidas e cedidas pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, SP). A cultivar é proveniente do cruzamento CR88258.

A assepsia das sementes foi feita com 2 gotas de detergente tween 20 em 50 ml de água por 12 minutos, posteriormente as mesmas foram tratadas em 50 ml de etanol 70 % por 2 minutos e por último foram lavadas em 50 ml de hipoclorito de sódio comercial (concentração de 3%) por um período de 35 minutos. Para essas proporções sempre foi utilizado 1 g de semente, com agitação moderada em todas as etapas. Finalmente as sementes foram enxaguadas de 4 a 5 vezes com água Milli-Q estéril no fluxo laminar.

A germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas foram realizados *in vitro* em meio de cultura MS sólido (MURASHIGE & SKOOG, 1962) (figura 7A e B), com modificações, em temperatura constante de 25° C e fotoperíodo de 12 horas. As plântulas foram coletadas com 28 dias de tratamento.





Figura 7. Plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS. Plântulas com 6 dias de cultivo e em B com 30 dias.

3.2 Preparação do Meio de Cultura

Foram preparados meios de cultura baseados em MURASHIGE & SKOOG (1962), conforme descrito abaixo:

Solução de Macronutrientes: KNO_3 190 mg.L⁻¹, NH_4NO_3 165 mg.L⁻¹, $CaCl_2.H_2O$ 44 mg.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 37 mg.L⁻¹, KH_2PO_4 17 mg.L⁻¹.

Solução de Micronutrientes: $MnSO_4.4H_2O$ 4,4 mg.L⁻¹, ZnSO₄.7H₂O 1,7 mg.L⁻¹, H₃BO₃ 1,2 mg.L⁻¹, KCl 0,16 mg.L⁻¹, NaMnO₄.2H₂O 50 µg.L⁻¹, CuSO₄.5H₂O 5 µg.L⁻¹, CaCl₂.6H₂O 5 µg.L⁻¹

Após a adição dos macro e micronutrientes, acrescentou-se 27 mg.L-1 de Fe-EDTA, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 0,1 mg.L⁻¹ de tiamina, 2 g.L⁻¹ de phytagel e sacarose foi removida no meio SS (Meio MS Sem Sacrose). O pH foi ajustado para 5,8 com KOH e a esterilização foi realizada em autoclave a 120 °C por 15 minutos.

3.3 Tratamentos realizados

Para a padronização da metodologia de assepsia, foram testadas duas concentrações de etanol (70 e 80%), duas concentrações de hipoclorito de sódio comercial (Cândida) 50 e 100% e por último três tempos de exposição ao hipoclorito (20, 35 e 60 minutos). As sementes foram submetidas a dois tratamentos: Meio MS MURASHIGE & SKOOG (1962), que já contém 20 mg.L⁻¹ de sacarose e meio SS, que é o mesmo meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), no entanto, sem adição de sacarose.

As plântulas foram divididas em 2 grupos: meio sem sacarose (SS) e com sacarose (MS), e foram mantidas nessas condições por 28 dias. As plântulas foram coletadas a cada 6 horas, completando um ciclo de 24 horas de coleta. O fotoperíodo no qual as plantas estavam expostas foi de 12 horas (com luz das 7 horas às 19 horas). E em todos os experimentos foram separadas a parte aérea do sistema radicular das plântulas.

3.4 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado com 3 frascos, cada qual representando uma repetição contendo aproximadamente 20 plantas. Aos dados quantitativos obtidos, aplicou-se análise de variância, Anova one-way, e, nos casos significativos, comparou-se as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (GOMES, 1990). Médias assinaladas com letras, diferem significativamente.

3.5 Quantificação de carboidratos solúveis

Para a quantificação de carboidratos solúveis foi utilizado o material vegetal congelado em nitrogênio líquido. Com o auxílio de cadinho e pistilo o material foi pulverizado e após essa etapa, liofilizado. Em seguida, 20 mg do pó obtido de cada uma das amostras foram submetidos à extração com 2 mL de etanol 80% (v:v) durante 20 minutos a 80 °C por 5 vezes, para a completa extração dos açúcares solúveis. Todo sobrenadante obtido foi misturado e reduzido a 1 ml em speed vac, posteriormente uma alíquota de 20 μ l foi utilizada para quantificação de açúcares solúveis totais utilizando o método colorimétrico fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), foi utilizado glucose 1 mg.ml⁻¹ como padrão.

3.6 Quantificação dos açúcares redutores

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada pelo método colorimétrico SOMOGY-NELSON (SOMOGY, 1945). Foi utilizada uma alíquota proveniente da mesma extração dos açúcares solúveis e nesse caso também foi usada glucose (1 mg ml-¹) como padrão.

36

3.7 Extração e análise dos monossacarídeos neutros da parede celular

Para a análise de monossacarídeos neutros da parede celular, o pellet proveniente da extração dos açúcares solúveis foi lavado diversas vezes com água Milli-Q (até a retirada total do resíduo de etanol) e seco em liofilizador. Posteriormente, foram submetidas à hidrólise ácida. Um mg de material seco foi transferido para um tubo cônico. Em seguida, foram adicionados 100 μ l de ácido sulfúrico 72%, e mantido em banho a 30° C por 45 minutos. Após este período de pré-hidrólise, foram acrescidos ao tubo 1,7 ml de água destilada e o material foi autoclavado por 1 hora a 120 °C. Em seguida o material foi neutralizado com hidróxido de sódio 50% (p/v) e centrifugado (9.000 x g por 5 minutos) por último foi submetido à coluna de troca iônica (Dowex®) para retirada de sais.

Os monossacarídeos presentes foram analisados por cromatografia de troca iônica de alta performance (High Performance Anion Exchange Chromatography-HPAEC) AS 500 (Dionex-Sunnyvale, CA) com coluna CARBOPAC PA1 associada à detecção por pulso amperométrico (PAD). Para os monossacarídeos o programa utilizado foi uma eluição isocrática de água Milli-Q (0,9 ml.min-1) durante 30 minutos, seguida de recuperação da coluna com NaOH 0,5 M por 15 minutos, tendo como padrão: fucose (Fuc), arabinose (Ara), rhamnose (Ram), galactose (Gal), Glucose (Glu), xilose (Xil) e manose (Man) 0,1 mM.

3.8 Quantificação de amido

A partir da extração dos açúcares solúveis totais, o pellet foi lavado 3 vezes com água Milli-Q e liofilizado para secagem, depois foram reservados 10 mg desse material e foi utilizado o método enzimático para dosagem de amido (AMARAL et al., 2007). As etapas para quantificação de amido estão resumidas na figura 8.

37



Figura 8. Esquema das principais etapas da extração de açúcares solúveis e monossacarídeos

4. RESULTADOS

4.1 Assepsia das sementes

Para avaliação das condições de assepsia durante a germinação e desenvolvimento das plântulas foram feitas combinações associadas de agentes desinfestantes visando as melhores respostas em relação a germinação das sementes e os índices de contaminação principalmente, por fungos no meio de cultura. Tratamentos realizados:

- Duas gotas de detergente tween 20 por 12 minutos, seguido de 2 minutos em etanol 70% e por último 20 minutos no hipoclorito de sódio comercial (Cândida) na concentração de 50%.
- Duas gotas de detergente tween O 20 por 12 minutos, seguido de 2 minutos em etanol 70% e por último 35 minutos no hipoclorito de sódio comercial (Cândida) na concentração de 50%.
- Duas gotas de detergente tween 20 por 12 minutos, seguido de 2 minutos em etanol 70% e por último 35 minutos no hipoclorito de sódio comercial (Cândida) na concentração de 100%.
- 4) Duas gotas de detergente tween O 20 por 12 minutos, seguido de 2 minutos em etanol 70% e por último 60 minutos no hipoclorito de sódio comercial (Cândida) na concentração de 100%.

No tratamento 1, onde o tempo de exposição ao hipoclorito foi relativamente curto, e concentração foi de 50% todo material foi contaminado por fungos. No tratamento 4, em que a exposição ao hipoclorito demorou 60 minutos, nenhuma semente germinou, mostrando assim alta toxicidade aos embriões. Entre os tratamentos 2 e 3, o tratamento 3 apresentou uma taxa de

germinação 20% menor que o tratamento 2, no entanto ficou 70% livre de contaminação por agentes externos (fungos), enquanto que o tratamento 2 foi contaminado em 50%.

4.2 Efeito da composição do meio de cultura, horário de coleta do material vegetal e as metodologias para análises dos carboidratos.

Na figura 9A, na parte aérea das plântulas submetidas ao tratamento (SS), onde a sacarose não foi acrescentada ao meio de cultura, percebemos que às 6 horas ocorreu um pico de açúcar em relação aos demais horários. No meio MS (onde há presença de sacarose no meio de cultura) ao longo do dia não houve variações significativas nos teores dos açúcares solúveis totais.

Na figura 9B, que se refere aos teores de açúcares redutores na parte aérea das plântulas submetidas aos tratamentos SS e MS, podemos observar praticamente a mesma situação relatada em relação às variações dos açúcares solúveis totais, inclusive no tratamento SS, também ocorreu um pico de síntese de açúcares redutores.

A sacarose é um tipo de açúcar solúvel não-redutor, com isso, fazendo a subtração dos açúcares redutores dos solúveis totais encontramos o valor correspondente ao teor de sacarose na amostra. Na tabela 2 são mostrados os teores de sacarose na parte aérea das plântulas de cana-de-açúcar. No tratamento sem sacarose, o teor deste açúcar na parte aérea de plântulas de cana apresentou um pico as 6 h e depois decresceu linearmente durante o dia. Já no tratamento em que as plântulas foram cultivadas em meio contendo sacarose, o pico ocorreu as 12 h. Além disso, o nível máximo atingido às 12 h foi o dobro no tratamento com sacarose.



Figura 9: A. Teores de açúcares solúveis totais ; B. Teores de açúcares redutores na parte aérea de plântulas de cana-de-açúcar com 28 dias de tratamento em meio MS (há presença de sacarose) e no meio SS (sem sacarose) ao longo de 24 horas de coleta. A análise estatística utilizada foi Anova one-way (n=mix de 20 plantas; 3 repetições). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \le 5\%$).

Tabela 2. Concentração de Sacarose na parte aérea de plântulas de cana-de-açúcar em diferentes horários de coleta em meio de cultura contendo sacarose (MS) e sem adição de sacarose (SS). A análise estatística utilizada foi Anova one-way (n=mix de 20 plantas; 3 repetições). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \le 5\%$).

Horário de coleta	Meio Sem Sacarose (SS)	Meio Com Sacarose (MS)
0 h	19,41 ± 1 cd	29,29 ± 0,3 b
6 h	29,34 ± 1 b	27,78 ± 0,5 bc
12 h	24,59 ± 0,5 bc	44,98 ± 0,5 a
18 h	$20,06 \pm 0,5 \text{ d}$	29,86 ± 3 bc

Com relação às dosagens dos carboidratos realizadas nas raízes, os dados serviram de parâmetros para a alteração na metodologia nos experimentos posteriores, já que os teores de açúcares redutores foram maiores que os dos açúcares solúveis totais, sugerindo dessa forma, que os valores encontrados para sacarose no sistema radicular seria negativo. Isto provavelmente foi ocasionado pela grande quantidade de compostos redutores, como aminoácidos, por exemplo, presentes no referido tecido.

A análise dos monossacarídeos na fração total da parede celular de plântulas de cana-deaçúcar (figura 10) mostra em ambos os tratamentos (MS e SS) tanto na raiz quanto na parte aérea resultaram em uma predominância dos polissacarídeos de xilose, arabinose e glucose. A glucose pode ser proveniente da solubilização do β -glucano, e a grande quantidade de xilose e arabinose seria justificada pela formação do arabinoxilano. Os resultados mostram, na parte aérea apenas, um efeito discreto da sacarose (meio MS) que induziu a uma pequena diminuição na proporção de manose com concomitante aumento proporcional de xilose e arabinose (embora não tenha acontecido de forma significativa).



Figura 10. Composição dos monossacarídeos neutros da fração total da parede celular da parte aérea e do sistema radicular plântulas de cana-de-açúcar com 28 dias de tratamento em meio sem sacarose e meio MS (contendo sacarose. A análise estatística utilizada foi Anova one-way (n=mix de 20 plantas; 3 repetições). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \le 5\%$).

5. DISCUSSÃO

Sabe-se que um dos maiores desafios no estabelecimento *in vitro* das espécies agrícolas, está na obtenção de tecidos livres de contaminação (BIANCHI et al., 2003), tendo em vista que eles permanecem um bom período no campo, estando mais susceptíveis aos microorganismos (bactérias, fungos, entre outros). E em função disso, são rotineiramente contaminados tanto interna como externamente por patógenos que são difíceis de controlar, sendo que a desinfestação e desinfecção podem causar danos aos tecidos ou mesmo levá-los à morte (ANDRADE et al., 2000). A qualidade sanitária das sementes é fator essencial para a instalação de qualquer cultivo, a qual pode determinar a qualidade das plântulas delas originadas (SANTOS et al., 2001; GALLOTTI, 2002).

No presente trabalho, a assepsia foi fundamental na redução da incidência dos fungos associados às sementes. Os fungos são apodrecedores de sementes, causam redução na germinação e vigor pela deterioração e morte dos embriões, sua presença está associada a condições inadequadas de armazenamento, como alta umidade e temperaturas elevadas (MACHADO, 1988). Quando a ação do hipoclorito de sódio reduz sua incidência, indica que os mesmos se encontram localizados na superfície externa das sementes (MUNIZ et al, 2007), principalmente no tegumento e pericarpo (COUTINHO et al, 2000). A tolerância dos embriões aos agentes químicos para desinfestação se deve muitas vezes a composição e ao tipo de semente de cada espécie (SABÁ et al, 2002; CHAVES et al. 2005). Por essa razão, é necessária uma avaliação preliminar para formulação de um protocolo de desinfecção. Sabe-se no entanto, que quanto maior o tempo de exposição ao etanol e hipoclorito, menor é a contaminação por microorganismos (NIETSCHE et al, 2006; SOFIATTI et al, 2008), assim como a germinação das sementes, dados também vistos em nossos experimentos.

No presente trabalho, foi constatado que o hipoclorito é altamente nocivo aos embriões de cana-de-açúcar. Além disso, o longo tempo de exposição são determinantes na viabilidade os embriões de cana-de-açúcar foi utilizado hipoclorito comercial (concentração de 3%) por 35 minutos.

O meio de cultura constitui um dos fatores fundamentais no processo de produção de plântulas, permitindo um melhor aproveitamento do potencial produtivo das espécies (GALOTTI, 2002). O tipo de substrato interfere diretamente na capacidade de germinação de sementes e na qualidade das plântulas produzidas, pela capacidade de retenção de água, absorção de luz e microrganismos presentes (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). De acordo com MINAMI & PUCHALA (2000), as características físicas e químicas do substrato favorece o desenvolvimento das plântulas. No entanto, boas condições encontradas no meio de cultura pelos embriões, também pode favorecer a proliferação de contaminantes exógenos ao meio, PICOLOTTO et al. (2004). Nossos dados mostraram que no meio SS (sem sacarose) os níveis de contaminação fúngica foram mais baixos quando comparados com o meio MS (contendo sacarose). Vários autores (PASCAL et AL, 2002; NICOLOSO et al, 2003; RODRIGUES et al, 2006) relatam também que a sacarose presente no meio de cultura favorece acúmulo de biomassa, influenciando dessa maneira o crescimento das plântulas. Em nossos experimentos, a presença de sacarose no meio mostrou uma pequena oscilação (não significativa) nos teores de todos os carboidratos estudados ao longo do dia, o que não reflete uma situação enfrentada pelas plantas.

Na grande maioria das plantas parte dos fotoassimilados são acumulados como amido, sendo a planta de cana-de-açúcar uma das exceções. Nossos dados mostraram que mesmo em

fase de plântulas esse processo também não ocorreu, já que as dosagens de amido realizadas foram desconsideradas por apresentarem valores muito próximos a zero.

A presença de sacarose afeta a produção de metabólitos secundários de grande importância nos processos metabólicos e na composição da parede celular (PASQUAL, 2001; KAGIKI et al., 2004), no entanto estudos comprovaram que essas alterações podem não ocorrer em condições de cultivo *in vitro*, já que a variabilidade da parede celular, parece estar principalmente associada com a proteção contra perda de água por transpiração. Nossos dados mostraram que não houve mudanças significativas na composição da parede celular das plântulas nos tratamentos MS e SS.

Os resultados apresentados permitiram definir o melhor tratamento de assepsia para obter plântulas de cana-de-açúcar em desenvolvimento por pelo menos 30 dias. Esta parte do trabalho foi fundamental, pois os níveis de contaminação sem qualquer tratamento simplesmente impedem o cultivo de plântulas, assim como determinar o horário de coleta para não termos grandes variações em função de alterações naturais ocorridas no metabolismo das plantas.

6. CONCLUSÕES

- A assepsia das sementes com hipoclorito de sódio e etanol de forma associada reduziu a incidência de fungos nas sementes de cana-de-açúcar (foi determinado exposição de 2 minutos ao etanol 70% e 35 minutos em hipoclorito comercial 100%).
- A presença de sacarose no meio de cultura, afetou a resposta das plântulas em relação ao acúmulo de açúcares solúveis totais, redutores e de sacarose, além de favorecer a propagação de microorganismos.
- Na análise dos monossacarídeos neutros da fração total da parede celular da parte aérea das plântulas, os principais polímeros encontrados foram o arabinoxilano e o β-glucano, e que os tratamentos realizados (meio contendo ou não sacarose), não interferiram de maneira significativa nessa composição.
- Às 6 horas ocorreu um pico de AST, AR e sacarose nas plântulas cultivadas sem sacorese e por essa razão as plântulas não foram coletadas próximas a esse horário.
- Não foi detectado amido nos tecidos das plântulas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFONSI, R.R., PEDRO JR., M.J., BRUNINI, O., BARBIERI, U., 1987. Condições climáticas para a cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. et al. Cana-de-açúcar; cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill. p.42-55.
- AMARAL, L. I. V. do; GASPAR, M.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M. & BUCKERIDGE, M. S., 2007. A new rapid sensitive enzymatic method of extraction and quantification of starch in plant material. Hoehnea, 34(4): 425-431.
- ANDRADE, M. W. de; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. & MELO, P. R. A., 2000. Micropropagação da aroeira (Myracrodruon urundeuva). Ciên. Agrot. 24: 174-180.
- BIANCHI, V. J.; CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W. & FACHINELLO, J. C., 2003. Estabelecimento in vitro de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em hipoclorito de sódio. Rev. Bras. Agro. 9:(2): 177-179.
- CARVALHO, N. M. & NAKAGAWA, J., 2000. Germinação de sementes. In: Sementes: Ciência, tecnologia e produção. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 128-166.
- CASTRO, P. R. C., 1999. Maturadores químicos em cana-de-açúcar. In: Semana da cana-deaçúcar de Piracicaba – SECAPI 4. Piracicaba: Anais.
- CHAPMAN, G. P., 1996. The biology of grasses. CAB. International, Wallingford, 288 p.
- CHAVES, A. C.; SCHUCH M, W. & ERIG, A. C., 2005. Estabelecimento e multiplicação in vitro de Physalis peruviana L. Ciên. Agrotéc. 29 (6): 1281-1287.
- COUTINHO, W. M.; PEREIRA, L. A. A.; MACHADO, J. C.; FREITAS-SILVA, O.; PENA, R.
 C. M.& MAGALHÃES, F. H. L., 2000. Efeitos de hipoclorito de sódio na germinação de conídios de alguns fungos transmitidos por sementes. Fitop. Brasil. 25 (3): 552-555.

- FIGUEIREDO, P., LANDELL, L. G. A. & CAMPNA, M. P., 1995. Cana-de-açúcar. 6.ed. Campinas: IAC.
- GALLOTTI, G. J. M., 2002. Doenças fúngicas em viveiros de erva-mate. Agrop. Cat. 15 (3): 62-64.
- KAGIKI, F. O.; GONÇALVES, G. C.; OLIVEIRA, E. T.; CROCOMO, O. J.; GALLO, L. A., 2004. Indução de calos e produção de saponinas totais em Pfaffia glomerata (Spreng.). Pedersen In vitro. Revista Brasil. de Plantas Medicinais, Botucatu, v.7, n. 1, p. 43-50.
- KELLOG, E. A., 1998. Relationships of cereal crops and other grasses. Proc. Nat. Acad. Sci. 95: 2005-2010.
- LIMA, D. U.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M .A.; MOLLE, F. D. & BUCKERIDGE, M. S., 2001. Patterns of expression of cell wall related genes in sugar cane. Genetics and Molecular Biology 24: 191-198.
- MACHADO, E. C., 1987. Fisiologia de produção de cana-de-açúcar. In: Cana-de-açúcar; cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill. p.56-87
- MACHADO, J. C,. 1988. Patologia de sementes fundamentos e aplicações. Lavras: UFLA/FAEPE, 107p.
- MALAVOLTA, E. & HAAG, H. P., 1964. Cultura e adubação da cana-de-açúcar. São Paulo: Instituto Brasileiro de Potassa.
- MINAMI, K. & PUCHALA, B., 2000. Produção de plântulas de hortaliças de alta qualidade. Horticultura Brasileira, Brasília, v.18, p. 162-163. Suplemento.
- MUNIZ, M. F. B.; SILVA, L. M. & BLUME, E., 2007. The effect of asepsis and substrate composition on tree seed and seedling quality. Rev. Bras. Sem. 29.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F., 1962. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

- NICOLOSO, F. T. et al., 2003. Efeito de concentrações e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen) cultivadas in vitro. Ciên. Agrot. 27: 84-90.
- NIETSCHE, S.; MARQUES, S. V.; PEREIRA, M. C. T.; SALLES, B.; XAVIER, A. A.; FRANÇA, A. C.; LIMA, C. & SILVA, L .S,. 2006. Estabelecimento in vitro de três cultivares de bananeira. Ciênc. Rur. 36: 988-991.
- NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; SANTOS, D. N.; CUSTÓDIO, T. N. & ARAÚJO, A. G. de, 2008. Different supplements for in vitro embryo culture of physic nut. Pesq. Agropec. Bras. 43: 9-14
- PARANHOS, S. B., 1987. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill. V.1, p. 431.
- PASQUAL, M., 2001. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. Cultura de tecidos vegetais. Lavras: UFLA/FAEPE. 74P.
- PICOLOTTO, L. ; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J. & FACHINELLO, J. C., 2004. Desinfestante e sacarose no estabelecimento in vitro de sementes de Romã. http://www.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CA_01122.rtf.
- PINTO, E. de S.L., 1965. Cana-de-açúcar. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura.
- RODRIGUES, M. M; MELO M. D & ALOUFA, M. A. I., 2006. Propagação vegetativa in vitro e análise estrutural de macieira. Pesq. Agrop. Brasil. 41: 171-173.
- SABÁ, R. T.; LAMEIRA, O. A.; LUZ, J. M. Q.; GOMES, A. P. do R.; INNECCO, R., 2002. Micropropagação de jaborandi. Hortic. Bras., 20: 106-109.
- SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S.; SANTANA, D. L., 2001. Fungos associados a sementes de espécies arbóreas da mata atlântica. Colombo: EMBRAPA/CNPF, Bol. Pesq. Flor. 42: 51-60.

- SEGALLA, A. L., 1964. Botânica, melhoramento e variedades. In: Pinto, E de S.L. 1965. Canade-açúcar. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura.
- SILVA, A. M. d., 2005. CARACTERIZAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE GRAMÍNEAS. CAMPINAS, 93p.
- SOMOGY-NELSON, M., 1945. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., 160:61-63.

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

Parte II – Efeito do GA₃ sobre o metabolismo de carboidratos e de genes possivelmente relacionados com esse processo em plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro*

RESUMO

A importância sócio-econômica da cana-de-açúcar despertou grande interesse na obtenção de dados para um melhor entendimento dos processos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem nessa cultura. Durante o desenvolvimento da planta de cana-de-açúcar ocorre o acúmulo de sacarose durante a maturação dos entrenós. E o grande interesse em se estudar plantas de cana-de-acúcar se dá exatamente pelo acúmulo dessa sacarose, que pode ser utilizada na indústria sucroalcooleira, através da produção direta de açúcar comercial ou ainda como biocombustível, na forma de etanol. A genética clássica busca o desenvolvimento dessa característica, principalmente através do aumento da biomassa realizada pela fixação de carbono, no entanto, há um limitado aumento do conteúdo de sacarose. A cana-de-acúcar passou a ser o modelo de estudo do Projeto SUCEST (Sugarcane EST), desenvolvido em rede por vários laboratórios do Estado de São Paulo com apoio financeiro da FAPESP. O projeto EST da cana-de-açúcar no Brasil, o SUCEST (http://sucest-fun.org) disponibilizou um conjunto básico e fundamental de dados para um maior entendimento dos processos fisiológicos e bioquímicos da cana-de-açúcar e contém milhares de genes expressos em seus diferentes órgãos, como raiz, colmo, folhas, flores e sementes. Através de estudos dos genes envolvidos nestas vias conservadas está sendo possível fazer inferências sobre diferentes aspectos do metabolismo da cana-de-açúcar. O esclarecimento

do modo de ação de cada produto gênico dentro das vias metabólicas revela potenciais alvos para o melhoramento dirigido das variedades de cana-de-açúcar. A giberelina é um fitormônio vegetal, largamente utilizado na forma sintética na agricultura e desempenha uma variedade de funções fisiológicas em plantas, seus efeitos biológicos foram amplamente explorados no sentido de beneficiar a agricultura. O GA₃ produzido industrialmente tem sido aplicado para estimular o crescimento da cana-de-açúcar, para auxiliar a germinação de cevada, na produção de frutas e verduras, entre outras. As giberelinas são extremamente ativas na indução do alongamento do caule. Estudos mostram que a aplicação de GAs provoca aumento no tamanho da célula e no número de células, indicando que as GAs atuam tanto no alongamento da célula como na divisão celular, o que potencializar um aumento na produtividade de sacarose. Já o paclobutrazol (PBZ) atua inibindo a biossíntese de giberelinas. Ele bloqueia a biossíntese de GA, pois interfere nos três primeiros passos da rota de oxidação do caureno, impedindo a formação do ácido entcaurenóico, e por isso funciona como um controle negativo dos mecanismos de ação das giberelinas. Tanto a presença do PBZ quanto da GA_3 induzem alterações da expressão de genes específicos e a ativação de vias de sinalização que agem cooperativamente na tentativa de aliviar o efeito do estresse na tentativa de estabelecer o retorno à homeostasia celular. Para nossos estudos foram selecionados genes que pudessem apresentar relação com metabolismo de carboidratos, com respostas hormonais, com metabolismo de ácidos nucleícos, com a fotssíntese, com o desenvolvimento, com divisão celular, com metabolismo de proteínas, além de diversos fatores de transcrição que possam estar envolvidos nesses processos, baseados em resultados do metabolismo de carboidratos encontrados nas análises bioquímicas das plântulas, assim como nos cortes anatômicos. OS dados mostraram que vários genes de diversas vias metabólicas foram alterados na presença tanto no tratamento utilizando o paclobutrazol quanto o GA₃.

SUMARY

The economic social importance of the sugarcane aroused great interest in obtaining data for a better understanding of the physiological and biochemical processes that occur in this culture. During the sugarcane development the plant accumulates sucrose during internodes maturation. And the great interest in studying sugarcane just happens by the sucrose accumulation, which can be used in the ethanol industry through the direct production of commercial sugar or as biofuel in the ethanol form. Classical genetics seeks to develop this feature, mainly by increasing the biomass held by sequestration, however, there is a limited increase in sucrose content. The sugarcane became the model for study of the SUCEST (Sugarcane EST) Project, developed by several network laboratories of the State of São Paulo with the FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa de São Paulo) support. The sugarcane EST project in Brazil, the sugarcane expressed sequence tag (http://sucestfun.org) provided a core set of importante data for a better understanding of the physiological and biochemical processes of sugarcane and contains thousands of genes expressed in their different organs such as roots, stems, leaves, flowers and seeds. Through genes studies involved in these pathways is preserved and you can make inferences about different aspects of the sugarcane metabolism. Elucidation of the action mode of each gene product in the metabolic pathways reveals potential targets for directed improvement of sugarcane varieties. The gibberellin is a phytohormone widely used in synthetic form in agriculture and plays a variety of physiological functions in the plants, their biological effects have been widely exploited to benefit agriculture. The GA₃ produced industrially has been applied to stimulate the sugarcane growth, to assist the germination of barley, the production of fruits and vegetables, among others. The gibberellins are extremely active in inducing the stem elongation. Studies show that the application of GAs causes an increase in cell size and cell number, indicating that GAs act both in cell elongation and cell division, which leverage an increase in sucrose yield. Since the PBZ acts by inhibiting the gibberellins biosynthesis. It blocks the GA biosynthesis, because it interferes in the first three steps of the kaurene oxidation patway and therefore acts as a negative control mechanisms of action of gibberellins. Both the presence of paclobutrazol and GA₃ induced changes in gene expression and activation of specific signaling pathways that act cooperatively in trying to alleviate the effect of stress in trying to establish a return to

cellular homeostasis. For our studies we selected genes that could present relationship with carbohydrate metabolism, hormonal responses, with the metabolism of nucleic acids, with photosynthesis with the development, with cell division, with protein metabolism, and several transcription factors that may be involved in these processes, based on results of the metabolism of carbohydrates found in the biochemical analysis of the seedlings, as well as in anatomical cuts. The data showed that several genes in several metabolic pathways were altered in the presence of both paclobutrazol and GA₃.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transporte e armazenamento da sacarose no tecido vegetal

A transferência da sacarose, das células do mesofilo para o floema, envolve a passagem através do plasmalema e da parede celular, envolvendo um "transportador de sacarose" que atua em associação com o transporte de potássio, dependente de energia metabólica. O carregamento de sacarose para as células companheiras do floema é realizado por um sistema de co-transporte com íons hidrogênio, os quais induzem a formação do gradiente eletroquímico necessário para a geração de energia no sistema ATPase da membrana. Este mecanismo funciona eficientemente sob condições de baixas concentrações de sacarose na parede celular, ocorrendo o transporte para o floema contra um gradiente de concentração. De acordo com KURSANOV (1984), citado por MAGALHÃES (1987), sempre que a concentração de sacarose no apoplasto atinge níveis incompatíveis com o funcionamento dos transportadores de sacarose, a enzima invertase ácida, presente na parede celular é ativada, hidrolisando a sacarose com a conseqüente produção de hexoses (DREIER et al, 1998; ROITSCH & GONZALEZ, 2004; ZHANG et al. 2007). Estas hexoses são transportadas de volta às células do mesofilo, sendo novamente convertidas a sacarose. A reciclagem da sacarose, entre o apoplasto e o simplasto, mantém a concentração deste açúcar na parede celular, visando o eficiente funcionamento dos transportadores de sacarose. Uma vez dentro das células companheiras, a transferência da sacarose para os tubos do floema é feita, de maneira preferencial, através dos plasmodesmos, a favor de um gradiente de concentração. Todo este processo até aqui descrito, ocorre na chamada "fonte", ou seja o local de produção de carboidratos, de onde serão translocados para os locais de consumo ou armazenamento, os chamados "drenos" (KUIPER, 1993; PATRICK 1997; ZHANG et al, 2007). Após a entrada da sacarose nos elementos de tubo crivado do floema da fonte, por este sistema
vascular ela será transportada até o tecido dreno. Este movimento ocorre por diferentes mecanismos, passivos e ativos. Os mecanismos ativos exigem energia metabólica, estando principalmente localizados nas zonas das placas crivadas. O grande fluxo do floema, no entanto, é formado por um gradiente de pressão de turgor entre as células do floema fonte e as do floema dreno, possuindo as do floema fonte maior pressão que as do floema dreno. Essa diferença de pressão estabelece-se, pelo contínuo carregamento do floema na fonte e descontínuo descarregamento do floema no dreno. O carregamento do floema fonte aumenta a sua concentração de sacarose, diminuindo o potencial osmótico de suas células, provocando a entrada de água e o aumento da turgescência; o aumento da pressão sobre o plasmalema causa deformação reversível de proteínas carregadoras de sacarose, o que impediria o enchimento total dos vasos (MAGALHÃES, 1987; ROLLAND et al, 2006). A sacarose se movimenta no floema por fluxo de massa, até atingir a célula dreno, onde sofre descarregamento ativo para o interior do vacúolo de uma célula do parênquima no colmo (Figura 11).



Figura 11. Mecanismos de controle das relações fonte-dreno para o transporte de sacarose na planta (Magalhães, 1987).

Ao sair do floema, a sacarose sofre inúmeras transformações, antes de ser armazenada no vacúolo. Essas transformações iniciam-se nos espaços externos do tecido parenquimatoso, onde a sacarose é transformada em glicose e frutose, pela ação da invertase. Essas hexoses penetrarão no citoplasma das células do parênquima do colmo, fora do vacúolo, por um processo de difusão. No citoplasma, as reações são mais complexas, devido ao fato das hexoses serem muito reativas e sofrerem processos rápidos de interconversão e fosforilação (WEBER et al, 1995; KINGSTON-SMITH et al, 1999). Ao contrário da entrada das hexoses no citoplasma, para penetrar no vacúolo a sacarose tem que ser ativada (sacarose-P), e a quebra da ligação fosfato fornece energia para a sacarose entrar no vacúolo, onde é acumulada. Como a concentração de sacarose é elevada no espaço interno (vacúolo), a absorção passiva não se processa, não entrando sacarose (MAGALHÃES, 1987; ROLLAND et al, 2006).

Segundo CASAGRANDE (1991), o mecanismo de acúmulo de sacarose é o mesmo, tanto em tecidos imaturos como em adultos, ocorrendo: a) hidrólise da sacarose, como um prérequisito é limitante da primeira etapa; b) formação e interconversão de hexoses fosfatos; c) formação de moléculas análogas à sacarose (talvez, sacarose-P) e d) acúmulo de parte da sacarose no vacúolo (COPELAND, 1990; LEE & STURM, 1996). Nos tecidos imaturos, onde predomina a rápida expansão celular, a sacarose acumulada é rapidamente hidrolizada pela invertase ácida vacuolar, e as hexoses resultantes movem-se rapidamente para o citoplasma, onde são utilizadas no crescimento e desenvolvimento celular (respiração, síntese de moléculas orgânicas, etc.) (KOCH & ZENG, 2002; BATE et al. 2004; SCHWEINICHEN & BUTTNER, 2005). Plantas adultas, em fase de maturação, ocorre aumento da ação da invertase neutra ou alcalina (com atividade máxima em pH 7,0), havendo correlação entre o nível de atividade desta enzima e a concentração de hexoses. A atividade quase nula da invertase ácida vacuolar, indica que está ocorrendo acúmulo efetivo de sacarose. Logo, durante a maturação, há declínio na atividade da invertase ácida dos espaços intercelulares (apoplasto), baixa atividade de invertase ácida do citoplasma e atividade quase nula de invertase ácida vacuolar. No caso dos tecidos em crescimento, a invertase ácida do apoplasto é secretada durante a formação das células, na região meristemática. A quantidade de sacarose acumulada depende da quantidade de invertase ácida secretada no apoplasto das células do tecido parenquimático, pois nesta fase nenhuma destas enzimas é secretada. Nas células adultas ou maduras, o que encontramos nas paredes celulares (apoplasto) seriam invertases ácidas insolúveis. Em função do exposto, percebe-se ser a maturação uma consequência de uma cinética de invertases, sendo importante entender a troca de invertases ácidas por invertases alcalinas ou neutras. Neste caso, a função de hidrolisar a sacarose em hexoses passaria a ser gradativamente efetuada pela invertase alcalina, indicando maturidade e a preparação do tecido para o acúmulo de sacarose (JI et al, 2005). Dessa maneira, as enzimas invertases dirigem os carboidratos para o crescimento da planta ou para o acúmulo dos mesmos nos vacúolos, onde o aumento da sua concentração vai proporcionar o amadurecimento ou maturação dos colmos, a qual ocorre quando a cultura apresentar a melhor produtividade qualitativa e quantitativa de açúcares (SONNEWALD et al, 1997; STURM & TANG, 1999.

1.2 Cana-de-açúcar e características de interesse

Os cultivares modernos de cana-de-açúcar possuem a capacidade de estocar de 12-17% de açúcares totais em relação ao seu peso fresco, das quais 90% é sacarose e 10% glicose ou frutose (WHEALS *et al.*, 2001). Durante o desenvolvimento da planta ocorre o acúmulo de sacarose durante a maturação dos entrenós (ZHU et al, 1996; WHITTAKER & BOTHA, 1997.

Esse acúmulo de sacarose é um do principais objetivos dos cruzamentos e a genética clássica contribuiu para o desenvolvimento dessa característica, principalmente através do aumento da biomassa realizada pela fixação de carbono, mas com um limitado aumento do conteúdo de sacarose (JACKSON, 2005). Um fator limitante do aumento do conteúdo de sacarose pode ser devido a um estreito pool de genes usados nos programas de cruzamentos, ou devido a um limite fisiológico de desenvolvimento da planta (JACKSON, 2005). No entanto, mecanismos moleculares associados à produção de sacarose, ao seu transporte e acúmulo nos entrenós, poderá permitir um aumento na produção de sacarose além dos limites atuais, tanto por cruzamento como por manipulação molecular (CASU *et al.*, 2005; MOORE, 2005).

1.3 A cana-de-açúcar e o Projeto Sucest

Com o surgimento dos estudos de genômica, a descoberta de genes de interesse tornou-se um processo mais rápido e eficaz na geração de informações úteis ao melhoramento genético (GRIVET & ARRUDA, 2001). Com isso vários projetos, denominados Projeto Genoma EST (*Expressed Sequence Tag*), se tornaram uma valiosa ferramenta para a descoberta de genes que são expressos em tecidos específicos, em fases distintas do desenvolvimento do organismo e em resposta a condições adversas de cultivo da planta. Os ESTs identificados podem revelar informações sobre centenas ou mesmo milhares de genes de um organismo em uma condição temporal e espacial única, além de permitir a identificação de diferentes isoformas de transcritos (ANDREWS et al., 2000) e auxiliar o mapeamento genético (SCHULER, 1997; WU et al., 2002). No projeto SUCEST (*Sugarcane EST*), desenvolvido em rede por vários laboratórios do Estado de São Paulo com apoio financeiro da FAPESP, foram disponibilizados um conjunto básico e fundamental de dados para um maior entendimento dos processos fisiológicos e bioquímicos da cana-de-açúcar e contém milhares de genes expressos em seus diferentes órgãos, como raiz, colmo, folhas, flores e sementes. O banco de dados GeneBank para cana-de-açúcar lista mais de 262.000 seqüências ESTs e 15.500 genes únicos de 26 bibliotecas de DNA construídas a partir de 11 tecidos em diferentes estágios de desenvolvimento (VETTORE et al., 2001). Os ESTs foram organizados em 43.141 clusters, dos quais 38% não apresentam similaridade com seqüências de bancos de dados públicos. Aproximadamente 53% dos clusters são formados por ESTs expressos de forma coordenada, em diferentes tecidos, enquanto que 47% são formados por ESTs tecido-específicos. VETTORE e colaboradores (2001) reagruparam esses 43 mil clusters, reportaram 22% de redundância e identificaram 33.620 genes únicos. A anotação dessas 43 mil seqüências mostrou que 50% delas estão associadas ao metabolismo de proteínas, transdução de sinais, bioenergética e respostas ao estresse. Os clusters dos ESTs obtidos correspondem aos SAS (*Sugarcane Assembled Sequence*), que representam genes de cana-de-açúcar classificados em diferentes categorias funcionais segundo critérios do Gene Ontology (www.geneoontology.org).

Os SASs representando componentes de vias de sinalização foram agrupados e organizados para formar o catálogo SUCAST (*Sugarcane Signal Transduction* – SOUZA et al, 2001). Em *Arabidopsis thaliana* existem mais de 5 mil genes catalogados para vias de transdução de sinal e portanto, pode-se estimar que em cana-de-açúcar exista também um número de genes dessa ordem. Durante a formação deste catálogo foram encontrados 477 receptores, 510 proteínas quinase, 107 fosfatases, 75 GTPases, 17 proteínas G, 114 proteínas de metabolismo de cálcio e inositol e mais de 600 fatores de transcrição, relacionados em diversos aspectos como transdução de sinal, transcrição, desenvolvimento, ciclo celular, resposta a estresse e a patógenos (SOUZA et al., 2001).

62

Através de estudos dos genes envolvidos nestas vias conservadas está sendo possível fazer inferências sobre diferentes aspectos do metabolismo da cana-de-açúcar, tais como os mecanismos de sinalização em resposta ao ataque de patógenos e a diferentes condições ambientais. O esclarecimento do modo de ação de cada produto gênico dentro das vias metabólicas revela potenciais alvos para o melhoramento dirigido das variedades de cana-de-açúcar.

O passo seguinte à identificação dos genes ou SAS das vias de transdução de sinal é a verificação do padrão de expressão destes genes, para que se possa inferir sua função nos diferentes tecidos, estágios de desenvolvimento e em resposta a determinadas condições ambientais em cana-de-açúcar.

1.4 Fitormônios

O desenvolvimento vegetal é regulado pela interação de fatores ambientais e endógenos (p.ex. fitormônios). Os fitormônios são substâncias orgânicas que ocorrem naturalmente nas plantas e influenciam o processo fisiológico sob baixas concentrações. Existem pelo menos seis classes hormonais com forte impacto no desenvolvimento, e que interagem entre si: auxinas (AUX), Citocicinas (CK), giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA), etileno (ET) e brassinoesteróides (BR), onde são gerados uma complexa rede de interações ambientehormônios-desenvolvimento.

1.4.1 Giberelinas

YABUTA & SUMIKI (1960) isolaram as primeiras giberelinas e em 1959 a estrutura planar da molécula já era conhecida (CROSS et al, 1959; CROSS, 1960). São conhecidas mais de 100

giberelinas já identificadas (**http://www.plant-hormones.info/gibberellin nomenclature.htm**), apenas uma pequena quantidade delas são ativas (MacMILLAM, 2002). Várias giberelinas que não são bioativas estão presentes nas plantas e servem como precursores para as formas bioativas ou servem como derivados metabólicos. Dentre as giberelinas ativas, as mais conhecidas são: GA₁, GA₃, GA₄, GA₇, GA₉ (YAMAGUCHI, 2008).

As giberelinas são biossintetizadas a partir do geranil-geranil difosfato (GGDP), um precursor comum dos diterpenóides (figura 12). Três classes de enzimas são necessárias para a biossíntese de giberelinas bioativas a partir do GGDP em plantas: terpenos sintases (TPSs), citrocromo P450 monooxigenase (P450s), e a 2-oxoglutarato dependente de dioxigenase (20DDs) (figura 13) (YAMAGUCHI, 2008).

Duas TPSs, ent-copalil difosfato sintase (CPS) e ent-caureno sintase (KS), estão envolvidas com a conversão do GGDP a ent-kaureno (figura 12). Tanto a CPS quanto a KS estão localizadas nos plastídeos (AACH et Al, 1997; SUN & KAMIRA, 94, 97; HELLIWELL et al, 2001). O ent-kaureno é convertido em GA₁₂ pela P450 e ent-caureno oxidase (KO) (desingnada CYP 701A, de acordo nomenclatura como com а (http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html) (NELSON et al, 2004), que catalisa a oxidação seqüencial no carbono 19 para formar o ácido ent-caurenóico, que é subsequentemente convertido em GA₁₂ por outra P450, ácido ent-caurenóico oxidase (KAO) (NELSON et al, 2004). A KO esta localizada no plastídeo, enquanto que a KAO esta no retículo endoplasmático (HELLIWELL et al, 2001) (Figura 13).

 GA_{12} é convertida em GA_4 (GA ativa), através da oxidação do C-20 e C-3 pela GA_{20} oxidase (GA_{20} ox) e GA 3-oxidase (GA_3 ox), respectivamente (figura 12). GA 20ox, catalisa a oxidação seqüencial do C-20, incluindo a perda de um carbono, na forma de CO2, formando

64

lactona. O GA 200x é responsável pela produção de GAs com 19 carbonos, usando GA C-20 como substratos. Algumas enzimas GA 30x possuem uma pequena atividade catalítica para sintetizar GA₃ e GA₄ a partir de GA $_{20}$ via GA₅ (SPRAY et al, 1996; APPLEFORD et al, 2001; ITOH et al, 2001) (figura 12). GA₁₂ também é um substrato para a GA₁₃ ox para a formação da GA₅₃, que é precursora da GA₁.

A desativação da GAs é importante para uma efetiva regulação da concentração de GAs bioativas nas plantas. As GAs são metabolicamente desativadas em diversas partes da sua via de síntese. No entanto, a melhor reação de desativação esta caracterizada na figura 12, que é catalisada pela reação 20DDs, GA 2-oxidase. Inicialmente a GA-20x usa as GA de 19 carbonos como substrato, incluindo também GAs bioativas e seus precursores imediatos (YAMAGUCHI, 2008).

1.4.1.1 Aplicabilidade das giberelinas

Os importantes efeitos biológicos das giberelinas foram amplamente explorados no sentido de beneficiar a agricultura. O GA₃ produzido industrialmente tem sido largamente aplicado na agricultura, exercendo uma variedade de funções fisiológicas (OZGA & DENNIS 2003; ZHANG et al. 2005). Elas são extremamente ativas na indução do alongamento do caule.



Figura 12. Via de biossíntese das giberelinas a partir do GGDP e sua desativação pela GA₂-oxidase. Estão em destaque as principais enzimas envolvidas no processo, e também as modificações químicas decorrentes da ação enzimática. A inibição pelo PBZ ocorre na enzima KO, impedindo a formação do ácido ent-caurenóico (YAMAGUCHI, 2008).



Figura 13. Localização de algumas enzimas que participam do metabolismo das GAs.TPS, terpeno sintase; CPS,*ent*-copalil difosfato sintase; KS, *ent*-caureno sintase; P450, citocromo P450 monooxigenase; KO, *ent*-caureno oxidase; KAO, ácido *ent*-caurenóico; ER, retículo endoplasmático; GGDP, geranilgeranil difosfato; 20DD,2-oxoglutarato-dependente de dioxigenase; GA2ox, GA3ox, GA16, 17ox, GA20ox, GA oxidases. (YAMAGUCHI, 2008).

Estudos mostram que a aplicação de GAs provoca aumento no tamanho da célula e no número de células, indicando que as GAs atuam tanto no alongamento da célula como na divisão celular (YANG et al, 1996) . De modo similar às auxinas, as GAs parecem induzir o alongamento celular alterando as propriedades da parede celular. Porém, diferente das auxinas, as GAs aumentam a extensibilidade da parede celular sem causar acidificação. De maneira geral, elas atuam em diversos fenômenos fisiológicos, no entanto, o gênero ou a espécie, somados a outros fatores podem determinar o efeito específico na resposta. Os processos fisiológicos envolvidos pelas giberelinas são germinação de sementes, mobilização de reservas armazenadas no endosperma durante o desenvolvimento de plântulas (ARTECA, 1996; BEWLEY, 1997; HIGASHI et al, 2002), crescimento da parte aérea, florescimento, desenvolvimento de flores, frutificação (HIGASHI et al, 2002).

1.5 Paclobutrazol

O paclobutrazol (PBZ) é um composto sintético aromático que contém 3 átomos de nitrogênio (MELO et al, 2006). Na agricultura possui propriedades reguladoras do crescimento vegetal, pois apresenta efeitos inibitórios sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas. O paclobutrazol [(2RS,3RS)-1-(4-clorofenil)-4, 4-dimetil-2-(1,2,4triazol)-3-pentanol] é um dos produtos mais efetivos em retardar o crescimento de plantas (FLETCHER et al., 2000) (figura 14).



Figura 14. Representação da estrutura química do paclobutrazol. Fonte: U.S. Environmental Protection Agency (2007).

O PBZ atua inibindo a biossíntese das giberelinas, pois interfere nos três primeiros passos da rota de oxidação do caureno, impedindo a formação de ent-caurenol, ent-caurenal e ácido entcaurenóico. Essas reações são catalisadas pela enzima caureno oxidase, que é inibida pela ação do PBZ (GRAEBE, 1987; RADEMACHER, 1997). Quando aplicados em condições adequadas (geralmente é aplicado no substrato, e é transportado pelo xilema, pois segundo GROSSI [2005] não mostrou efeito quando aplicado diretamente nas folhas), os retardantes de crescimento afetam uma série de características nas plantas, como o alongamento dos ramos e, conseqüentemente, a altura das plantas. Essa redução no alongamento normalmente ocorre sem que haja redução no número de entrenós dos ramos (BEROVA & ZLATEV, 2000). Também são observadas reduções na área foliar e aumento dos teores de clorofila, da espessura das folhas e

do crescimento do sistema radicular. Os efeitos morfológicos são acompanhados por alterações no desenvolvimento e fisiologia das plantas, reduzindo o consumo de água, atrasando o processo de senescência e aumentando a resistência a estresses ambientais (FLETCHER et al., 2000). Redução no número de brotações e no comprimento dos ramos, em razão do encurtamento dos entrenós dos citros, causados pela aplicação de PBZ, foram observados por DELGADO et al. (1995); OKUDA et al. (1996) e MATAA et al. (1998). Em tangelo 'Minneola', que é uma variedade do gênero Citrus, tratado com PBZ, durante a primavera, em aplicações foliares e no solo, houve redução no alongamento da brotação de verão; entretanto, ocorreu redução significativa no tamanho dos frutos, resultando em menor produtividade (GREENBERG et al., 1993). Diminuição no crescimento das plantas devido à aplicação de PBZ ocorre tanto em plantas adultas quanto em plântulas durante a fase de viveiro, assim como maior desenvolvimento do sistema radicular em algumas espécies (PASIAN & BENNETT, 2005). Entretanto, modificações nas características de crescimento das plantas nem sempre ocorrem. IWAHORI & TOMINAGA (1986) não observaram alterações no comprimento e número de brotos de cunquate 'Meiwa' (Lima ácida, gênero Citrus) em plantas tratadas com PBZ. DELGADO et al. (1995) também não notaram redução no comprimento da brotação de plantas podadas de Lima da Pérsia (gênero Citrus), logo após a aplicação do PBZ. OKUDA et al. (1996) observaram redução no número de folhas nas brotações de Citrus reticulata, provavelmente em vista da redução no comprimento dos brotos. No mesmo trabalho, DELGADO et al. (1995) constataram aumento nos teores de clorofila da folhas (Lima da Pérsia); todavia, esse aumento não se reflete na produção total de fotoassimilados pelas plantas, em conseqüência de redução na área foliar (DAVIS et al., 1988).

1.6 Fatores reguladores da transcrição gênica

A eficiência dos mecanismos moleculares e bioquímicos que controlam fenômenos biológicos tais como diferenciação, controle celular, desenvolvimento e resposta a estímulos ambientais está estritamente relacionada com a fina regulação da expressão gênica. Esta regulação assegura que uma determinada proteína seja produzida em sua exata quantidade, no momento e no local apropriado para que sua função biológica no desenvolvimento do organismo sejam cumpridos (NAAR et al, 2001).

As plantas estão constantemente submetidas a condições adversas do meio ambiente que restringem profundamente o desenvolvimento, crescimento e produtividade. Em respostas a estes estresses, as células vegetais desenvolveram um conjunto complexo de mecanismos de defesa que operam para aumentar a tolerância contra estas condições restritivas e são críticos para garantir a sobrevivência das plantas em geral. Essas alterações englobam a indução da expressão de genes específicos e a ativação de vias de sinalização que agem cooperativamente na tentativa de aliviar o efeito deletério do estresse e estabelecer o retorno à homeostasia celular. Em condições de campo, é provável que diversas condições de estresses atuem simultaneamente limitando o crescimento e a produtividade, sendo que a identificação de vias de sinalização de resposta em células afetadas por diferentes estresses, bem como das interações entres estas vias, constitui um dos interesses majoritários de pesquisas na área de interações das células vegetais com o meio ambiente. O nosso conhecimento sobre integração de vias de sinalização de respostas a diferentes estresses fisiológicos tem aumentado consideravelmente na última década com as análises de expressão gênica de alcance genômico em plantas submetidas a diversas condições de estresses (HOUDE et al., 2006, PAPINI-TERZI et al., 2005 e ROCHA et al., 2007) e a habilidade de regular a expressão de genes em plantas superiores, através de métodos

exógenos, apresenta vantagens consideráveis, tanto para a ciência básica quanto para a ciência aplicada na agricultura (GATZ, 1997).

1.7 Genes alvo

As metodologias tradicionalmente empregadas em ensaios de expressão gênica (*Northern blot*, RT-PCR) permitem avaliar um número muito pequeno de genes (TANIGUCHI et al, 2001). Nos últimos anos foram desenvolvidas algumas novas tecnologias que permitem a análise simultânea de um grande número de genes, como, por exemplo, os microarranjos de DNA, oligonucleotídeos e proteínas (SCHENA et al, 1995, 1998; LUEKING et al, 1999; BLOHN & GUISEPPI-ELEI, 2001). Os arranjos de DNA (DNA *microarrays*, DNA chips ou biochips) surgiram como uma alternativa promissora para monitorar a atividade do genoma de forma mais completa e integrada. A tecnologia de microarranjos de DNA permite a análise de milhares de genes em um único experimento, utilizando-se quantidades pequenas de RNA, possibilitando a condução de experimentos quantitativos em larga escala (EPSTEIN & BUTOW, 2000; SCHAFFER et al, 2000).

Foram selecionados então, a partir do experimento de microarray em condições de estresse hídrico realizado sob a responsabilidade do grupo da Dra. Glaucia Souza (IQ-USP), genes (SAS) responsivos (ROCHA et al, 2007; PAPINI-TERZI et al, 2009) que possam apresentar qualquer relação com metabolismo de carboidratos, com respostas hormonais, com metabolismo de ácidos nucléicleicos, com a fotossíntese, com o desenvolvimento, com divisão celular, com metabolismo de proteínas, além de diversos fatores de transcrição que possam estar envolvidos nesses processos, a partir de observações feitas no fenótipo das plântulas previamente analisadas bioquímica e anatomicamente. Também foram desenhados primers para avaliação de

genes envolvidos com a síntese e com sinalização de GA. Uma breve descrição das funções e das características estão disponíveis no anexo 6.

2. OBJETIVOS

• Avaliar a influência e compreender o mecanismo de ação do GA₃ no acúmulo de sacarose nas plântulas de cana-de-açúcar;

• Compreender o mecanismo de sinalização a partir da resposta gerada pelo GA₃ em potenciais genes-alvos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal e Condições de Cultivo

Foram utilizadas sementes de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) desenvolvidas e cedidas pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, SP). A cultivar é proveniente do cruzamento CR88258.

A assepsia das sementes foi feita com 2 gotas de detergente tween e 50 ml de água por 12 minutos, posteriormente as mesmas foram tratadas com etanol 70% por 2 minutos e por último foram lavadas com 50 ml de hipoclorito de sódio (comercial) 100 % por 35 minutos. Para estas proporções sempre foi utilizado 1g de semente, com agitação moderada em todas as etapas. Finalmente as sementes foram enxaguadas de 4 a 5 vezes com água Milli-Q estéril no fluxo laminar.

A germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas foram realizados *in vitro* em meio de cultura MS sólido (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com modificações, em temperatura constante de 25° C e fotoperíodo de 12 horas. As plântulas foram coletadas em diversas idades a partir de 1 dia de inoculação no meio de cultura até 28 dias de tratamento. O fotoperíodo foi das 7:00 às 19:00 h.

3.2 Preparação do Meio de Cultura

Foram preparados meios de cultura baseados em MURASHIGE & SKOOG (1962), conforme descrito abaixo:

Solução de Macronutrientes: KNO_3 190 mg.L⁻¹, NH_4NO_3 165 mg.L⁻¹, $CaCl_2.H_2O$ 44 mg.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 37 mg.L⁻¹, KH_2PO_4 17 mg.L⁻¹.

Solução de Micronutrientes: $MnSO_4.4H_2O$ 4,4 mg.L⁻¹, ZnSO₄.7H₂O 1,7 mg.L⁻¹, H₃BO₃ 1,2 mg.L⁻¹, KCl 0,16 mg.L⁻¹, NaMnO₄.2H₂O 50 µg.L⁻¹, CuSO₄.5H₂O 5 µg.L⁻¹, CaCl₂.6H₂O 5 µg.L⁻¹

Após a adição dos macro e micronutrientes, acrescentou-se 27 mg.L-1 de Fe-EDTA, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 0,1 mg.L⁻¹ de tiamina e 2 g.L⁻¹ de phytagel. Não houve, no entanto, o acréscimo de sacarose na constituição do meio. O pH foi ajustado para 5,8 com KOH e a esterilização foi realizada em autoclave a 120 °C por 15 minutos. Após o resfriamento parcial do meio foi adicionado o ácido giberélico (GA₃) e também o paclobutrazol (PBZ) ambos filtrados em filtro Millipore de 0,22 μ m.

3.3 Tratamentos realizados

Após a assepsia as sementes foram submetidas aos tratamentos: controle (meio Murashige & Skoog [1962], meio MS na presença de GA₃, que inicialmente foram 3 concentrações: 0.5 mg.L^{-1} , 5 mg.L^{-1} e 20 mg.L⁻¹ e finalmente foi adicionado PBZ ao meio MS na concentração 0.05 mg.L^{-1} . Para os cortes histológicos, as plântulas foram coletadas diariamente até 7 dias e depois em intervalos de 7 dias até 28 dias de tratamento (exceto as plântulas submetidas ao PBZ (que só foi feito corte aos 7 dias de tratamento), no entanto, para essa avaliação só foram utilizadas plântulas submetidas a concentração de 0.5 mg.L^{-1} de GA₃. Já para as análises bioquímicas foram utilizadas plântulas com intervalos de 7 dias até 28 dias de tratamento e finalmente para as análises moleculares foram utilizadas apenas as plântulas coletadas aos 21 dias de tratamento. Em todos os casos, o sistema radicular foi separado da parte aérea e não foi utilizado para as análises.

3.4 Parâmetros avaliados

Foram avaliados os seguintes parâmetros: desenvolvimento morfológico e anatômico, teores de açúcares solúveis totais, análise dos monossacarídeos da fração total da parede celular e o nível diferencial de expressão gênica da parte aérea das plântulas. Os procedimentos foram realizados nas plantas controle (crescidas em meio MS) e nas plântulas submetidas ao GA₃ na concentração de 0,5 m.L⁻¹. As plântulas tratadas com PBZ tiveram seu desenvolvimento bastante comprometido e houve limitação de biomassa para realização de todos os experimentos, sendo assim não foi possível avaliar todos os parâmetros.

3.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizados com no mínimo 6 frascos, cada qual representando uma repetição contendo entre 20 e 30 plantas. Aos dados quantitativos obtidos, aplicou-se análise de variância e, nos casos significativos, comparou-se as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (GOMES, 1990).

3.6 Preparação do material vegetal para microscopia óptica (MO)

As amostras foram fixadas à temperatura ambiente no vácuo em solução de KARNOVSKY (1965) por 24 horas, desidratado em série etílica crescente (JOHANSEN, 1940) até a deposição do material em etanol 95%, as amostras permaneceram em cada concentração de etanol por 6 horas.

O estudo anatômico foi realizado a partir de cortes histológicos longitudinais e transversais obtidos a partir de micrótomo rotativo em espessuras que variaram entre 5 e 8 µm. Para obtenção dos cortes em micrótomo rotativo, o material foi incluído em historresina

76

(KRAUS & ARDUIM, 1997), que seguiu o procedimento indicado pelo fabricante (LEICA). Os cortes foram corados com azul de toluidina 0,05% (p/v) e posteriormente a montagem realizouse com entellan. As análises e fotomicrografias em campo claro foram feitas no MO Leica DMR.

A medição das células foi realizada a partir do sofware TPS DIG version 2

3.7 Análises Morfológicas

Para as análises morfológicas, após a verificação do tamanho e peso, as plântulas foram foram fixadas para posterior confecção dos cortes histológicos. Esse procedimento foi realizado diariamente até 7 dias e após esse período em intervalos de 7 dias até completarem 28 dias de tratamento.

3.8 Análises Bioquímicas

3.8.1 Extração e análises dos açúcares solúveis totais

As plântulas tiveram a parte aérea separada do sistema radicular e foram coletadas entre 7 e 11 horas. Após a lavagem com água milli-q, foi adicionado nitrogênio líquido e o material foi pulverizado com auxílio de cadinho e pistilo. O pó já em microtubos foi colocado em liofilizador para secagem. Após essa etapa foi pesado 10 mg para extração dos açucares solúveis totais, ao qual se adicionou 2 ml de etanol 80% a 80°C por 20 minutos com agitação esporádica (McCREADY et al, 1950). Em seguida o material foi centrifugado (9.000 x g por 2 minutos) e o sobrenadante reservado. Ao todo foram realizadas 5 extrações. O número de extrações foi determinado após avaliação inicial em que foram dosados os teores de açúcares pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956) e foi confirmado que na extração subseqüente não havia mais detecção de açúcar (resultados não mostrados), utilizando como padrão glucose 100 mg.ml^{-1} . Todo o sobrenadante foi misturado e totalmente seco em speed vac, onde finalmente foi ressuspendido em 1 ml de água milli-q, centrifugado (9.000 x g por 5 minutos) e filtrado para análise de açucares solúveis totais em HPLC.

Os açúcares solúveis presentes foram analisados por cromatografia de troca iônica de alta performance (High Performance Anion Exchange Chromatography-HPAEC) AS 500 (Dionex-Sunnyvale, CA) com coluna CARBOPAC PA1 associada à detecção por pulso amperométrico (PAD). Para os açúcares solúveis o programa utilizado foi uma eluição isocrática de NaOH 100 mM (1 ml.min⁻¹) durante 20 minutos, seguida de recuperação da coluna com NaOH 200 mM por 5 minutos, com padrões de glicose (Glc), frutose (Fru) e sacarose (Sac) 5 mM (STANCATO et al, 2001).

O ajuste do método e a exploração dos cromatogramas foram realizados com auxílio do programa PeakNet Work Station e/ou Chromelion (Dionex). Os picos correspondentes a cada um dos açúcares glucose, frutose e sacarose, (Glc, Fru e Sac) foram identificados com base no tempo de detecção dos padrões e tiveram suas áreas convertidas em concentrações (figura 15).



Figura 15. Perfil de eluição de açúcares solúveis totais em coluna cromatográfica Carbopac PA1 por HPAEC

3.8.2 Extração e análise dos monossacarídeos neutros da parede celular

Para a análise de monossacarídeos neutros da parede celular, o pellet proveniente da extração dos açúcares solúveis foi lavado diversas vezes com água milli-q (até a retirada total do resíduo de etanol) e seco em liofilizador. Posteriormente foram submetidas à hidrólise ácida. 1 mg de material seco foi transferido para um tubo cônico. Em seguida, foram adicionados 100 μ l de ácido sulfúrico 72 %, e mantido em banho a 30°C por 45 minutos. Após este período de pré-hidrólise, foram acrescidos ao tubo 1,7 ml de água destilada e o material foi autoclavado por 1 hora a 120 °C. Em seguida o material foi neutralizado com hidróxido de sódio 50% (p/v), centrifugado (9.000 x g por 5 minutos) e submetido à coluna de troca iônica (Dowex®) para retirada de sais.

Os monossacarídeos presentes foram analisados por cromatografia de troca iônica de alta performance (High Performance Anion Exchange Chromatography-HPAEC) AS 500 (Dionex-Sunnyvale, CA) com coluna CARBOPAC PA1 associada à detecção por pulso amperométrico (PAD). Para os monossacarídeos o programa utilizado foi uma eluição isocrática de água milli-q (0,9 ml.min-1) durante 30 minutos, seguida de recuperação da coluna com NaOH 500mM por 15 minutos, com padrões de fucose (Fuc), arabinose (Ara), rhamnose (Ram), galactose (Gal), Glucose (Glu), xilose (Xil) e manose (Man) 0,1 mM (figura 16).



Figura 16. Perfil de eluição de monossacarídeos neutros em coluna cromatográfica Carbopac PA1 por HPAEC.

Resumo das etapas de extração dos açúcares solúveis totais e monossacarídeos (figura 17)



Figura 17. Esquema das principais etapas da extração de açúcares solúveis e monossacarídeos

3.9 Análises Moleculares: Todos os experimentos foram realizados no laboratório de Transdução de Sinal, da Dra. Glaúcia Mendes Souza (IQ-USP).

3.9.1 Extração e análise do RNA total

O RNA total da parte aérea das plântulas de cana-de-açúcar foi extraído, a partir de 100 mg de tecido, utilizando do reagente RNA Concert® (Invitrogen, USA), de acordo com procedimento recomendado pelo fabricante. Após macerar as amostras em nitrogênio liquído com auxílio de cadinho e pistilo (previamente resfriados), adicionou-se 500 µl do reagente RNA Concert® (Invitrogen, USA), seguido de homogeneização por 15 segundos, incubação à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugadas a 12.000 x g por 2 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa foi recolhida em um novo tubo, precipitada com NaOH (5M) e clorofórmio e centrifugadas a 12.000 x g durante 4 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi colocado em um novo tubo e precipitado em álcool isopropílico e centrifugado a 12.000 x g por 4 minutos Os pellets de RNA foram ressuspendidos em 100 µL de água DEPC (dietila 4 °C. pirocarbonato 0,01%), agitados gentilmente e estocados a -80 °C. Sua quantificação foi obtida mediante a leitura de uma alíquota de 1 µL de RNA em NanoDrop (Phamarcia). A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel 1% de agarose (Invitrogen) contendo 16% de formaldeído (Merck) como agente denaturante (Sambrook et al., 1989) e 10% de tampão MOPS 10x (MOPS 0,2 M, acetato de sódio 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7). A eletroforese foi corrida em tampão MOPS 1x a 90 V. Para a análise por eletroforese em gel de agarose, às amostras de RNA (1 µL), foram adicionados 2 µL de água DEPC e 3 µL de tampão de amostra (formamida 64,4%, MOPS 1,3 x, formaldeído 2,8%, azul de bromofenol 0,35%, 50 µg/mL de brometo de etídeo). Após a corrida, o gel foi fotodocumentado com o sistema ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech) e as amostras analisadas quanto à quantidade e integridade.

3.9.2 Purificação do RNA Total

Para a purificação do RNA total, utilizou-se o RNAeasy Mini Protocol for RNA

Clean up (Qiagen), e foram seguidas as instruções do fabricante. Foi utilizado um total de 100 µg de RNA e água DEPC em volume suficiente para completar o volume da reação para 100 µL. Neste mesmo tubo foram adicionados 350 µL de tampão RLT (previamente preparado com Betamercaptoetanol-10 µL/mL tampão). Posteriormente, ao mesmo tubo foram adicionados 250 µL de etanol 100%. Todo o conteúdo (700 µL) foi então aplicado em uma mini coluna de purificação ligada a um tubo coletor. Centrifugou-se a amostra por 15 segundos a 12.000 x g e o líquido coletado foi descartado. 500 µL de tampão RPE foram adicionados à mini coluna e, novamente, as amostras foram centrifugadas por 15 segundos a 12.000 x g e o líquido coletado descartado. Adicionou-se então, 500 µL de tampão RPE à mini coluna, centrifugou-se por 2 minutos a 12.000 x g e descartou-se, mais uma vez o líquido coletado. Mais uma centrifugação de 1 minuto foi necessária para se retirar o excesso do tampão. Em um novo tubo coletor foi feita a eluição, adicionando-se, 30 µL de água DEPC e centrifugando-se a 12.000 x g por 1 minuto; esse processo foi repetido, acumulando-se um volume total de 60 µL contendo o RNA purificado. O RNA foi então novamente quantificado e sua integridade novamente visualizada em um novo gel de agarose.

3.9.3 Extração e purificação do RNA total do material biológico

Foram feitas, no total, três extrações de RNA a partir de três experimentos distintos (tréplica biológica). Consideramos cada experimento, um pool de plântulas com aproximadamente 50 indivíduos controle (não tratadas), tratadas com PBZ 0,05 mg.L⁻¹ e GA₃ 0,5 mg.L⁻¹ submetidas a essas condições por 21 dias, conforme descrito anteriormente. As amostras

de RNA totais obtidas antes e depois do protocolo de purificação a partir de plântulas de canade-açúcar com idade de 21 dias, submetidas aos tratamentos com GA_3 0,5 mg.L⁻¹, PBZ e o controle podem ser visualizadas na figura abaixo (figura 18).



Figura 18. Exemplos de análise dos RNAs totais de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in* vitro por 21 dias em meio MS (controle), na presença de GA₃ 0,5 mg.L⁻¹e PBZ 0,05 mg.L⁻¹. As três primeiras bandas correndem aos RNAs após o processo de purificação e as três ultimas correspondem as bandas dos RNAs antes de passarem pelo processo de purificação. GA corresponde ao RNA das plântulas tratadas com GA₃ 0,5 mg.L⁻¹, PBZ corresponde as plântulas tratadas com PBZ 0,05mg.L⁻¹ e C corresponde as plântulas controle. Gel denaturante de agarose/fomaldeído 1% mostrando a integridade do RNA extraído, assim como após o processo de purificação dos RNA totais.

3.9.4 Reações de transcrição reversa para PCR em tempo real

5 μg de RNA (1-8 μL de RNA) total foram tratados com 3 μL da enzima DNase I Amplification Grade (Invitrogen, USA). Na reação ainda foi adicionado 1 μL de DNase reaction buffer 10x e quantidade suficiente de água para completar 10 μL. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos exatos e a ela foi adicionado 1 μL de EDTA 25 mM para finalizá-la, incubando-se a 65 °C por 10 minutos na temperatura ambiente, inativando-se assim a DNAse. Uma alíquota de 7,5 μL do RNA tratado foi utilizada para a reação de transcrição reversa usando-se o kit First-Strand cDNA Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) e seguidas as instruções do fabricante. Cada reação de transcrição reversa de 20 μL contém, além do RNA tratado com DNase, 2 µL de tampão de transcrição reversa 10x (Tris-Hcl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM), 1 µL de dATP, dGTP, dCTP e dTTP (10 mM), 50 ng de *primers* hexâmeros randômicos, 0,25 µg de *primer* oligo (dT) , 2 µL de MgCl2 25mM, 2 µL DTT 0,1 M, 40 U de *RNase* OUT, 50 U de *SuperScript II Reverse Transcriptase* e água DEPC em quantidade suficiente para 20 µL. Todos esses reagentes

são fornecidos pelo Kit citado acima. O RNA, hexâmeros randômicos, dNTPs e oligo (dT) foram misturados primeiro, incubados a 70 °C por 5 minutos e colocados em gelo. Posteriormente, os demais componentes, exceto a enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase*, foram adicionados à reação e a mistura foi aquecida a 25 °C por 10 minutos e depois, a 42 °C por 2 minutos. A enzima foi, então, adicionada a cada tubo e a reação foi incubada a 42 °C por 90 minutos, seguido por 72 °C a 10 minutos e imediatamente resfriada em gelo. Uma reação idêntica, mas sem a transcriptase reversa foi feita em paralelo para confirmar a ausência de DNA genômico nas reações de PCR em tempo real (*No Amplification Control*, NAC). O produto de cDNA foi tratado com 2U de RNaseH (Life Technologies) por 30 minutos a 37 °C e, posteriormente, armazenado a 20 °C.

3.9.5 Reações de PCR em tempo real (qRT-PCR)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) em um equipamento *GeneAmp 7300 Sequence Detection System* (Applied Biosystem). As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se de 0,6 µL do cDNA sintetizado diluído 1:10, *primer* R (reverse) 600 nM, *primer* F (foward) 600 nM, 6,0 µL de *SYBR Green PCR MasteR Mix* e água DEPC para um volume final de 12 µL. O ciclo para as reaçãoes de PCR em tempo real foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguido de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelas curvas de dissociação geradas pelo equipamento. Foram utilizados controles negativos sem adição de cDNA sintetizado para confirmar a ausência de qualquer tipo de contaminante no meio reacional (*No Template Control*, NTC), bem como controles negativos contendo, ao invés de cDNA, o produto da reação de NAC (*No Amplification Control*), diluído 1:5.

3.9.6 Validação dos dados de expressão gênica

Todos os genes selecionados passaram por um rigoroso processo de validação através do cálculo da eficiência da reação individual (E(%)=10(-1/Slope) – 1), e para a validação dos dados de expressão gênica, foi considerada a razão entre a quantidade relativa de determinado gene e o gene de referência (normalizador) foi determinada utilizando-se o método de 2 $^{-\Delta \Delta CT}$ (LIVAK & SCHIMITTGEN, 2001) com modificações. O nível de expressão normalizado foi calculado como L = 2 $^{-\Delta CT}$. Sendo $^{-\Delta CT}$ = CT, alvo – CT, referência, para cada experimento. O CT é definido como o número de ciclos em que a fluorescência na fase exponencial do PCR será convertida em dados de expressão gênica. O gene normalizador utilizado foi o UB (SAS SCCCLR1048F12.g). Para a avaliação da significância estatística das razões de expressão determinadas, um modelo log-normal foi assumido e a probabilidade P da razão de expressão entre amostra experimental e controle ser maior do que um e a probabilidade P dessa razão ser menor do que um. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando P \geq 0, 80.

3.9.7 Desenho dos primers

Os primers específicos foram desenhados usando o programa Primer Express 2.0 Software (Applied Biosystems). Os limites estipulados de temperatura de anelamento e tamanho do amplicon para seleção dos primers foram de 58 a 60 °C e de 100 a 150 pb, respectivamente. O par de primers selecionados para cada gene foi testado para: estabilidade, TM, conteúdo de base CG (%), e interações entre homodímeros e heterodímeros, através do programa Gene Runner, acessado em http://www.generunner.com. Os pares de primers para cada gene estão apresentados nos anexos 1 e 5. Os genes similares, pertencentes a uma mesma família ou classe funcional foram alinhados para comparação de sequências através do programa ClustalW 1,8 Sequence (BCM Search Launcher: *Multiple* Alignments). disponível em http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align.html.

3.9.8 Normalizadores

Um importante aspecto para as reações de qRT-PCR é o estabelecimento de qual gene deve ser usado como normalizador (referência interna). Certos fatores precisam ser controlados ao se trabalhar com a quantificação de expressão gênica em tempo real, dentre elas, podemos citar a quantidade de material inicial, anelamento dos primers, eficiência enzimática e as diferenças entre os diversos tecidos estudados quanto a atividade transcricional como um todo. Para isso, fez-se uma reação de qRT-PCR, na qual foram utilizados RNAs provenientes de amostras controle e tratadas (GA₃ e PBZ) e analisou-se o comportamento de doze possíveis genes normalizadores de funções básicas: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GADPH), poliubiquitina (PUB), ubiquitina (UB, UBQ10), enzima conjugadora de ubiquitina (UBE2), tubulina (TUB), actina (Act, Act 2, Act 11), domínio de fator de elongação Tu GTP (eEF 1α), proteína ribossomal 60S (60S), proteína ribossomal 25S (25S RNA), os quais são expressos em vários tecidos ou órgãos de cana-de-açúcar e encontrados em diversas bibliotecas de EST do projeto genoma de cana-de-açúcar, o SUCEST. Os SAS e os respectivos primers estão disponíveis no anexo 1.

Para verificar a especificidade dos genes, foi feita uma busca no algoritmo BLAST contra do banco de dados do SUCEST e as sequências que tiveram o maior grau de similaridade (evalue = zero) foram alinhados no ClustalW (anexo 2, 3 e 4) (conforme etapas descritas no material e métodos desse capítulo) e finalmente foram desenhados os primers (gene express 2.0), alguns primers já estavam disponíveis no lab. da Dra. Glaucia Souza (IQ-USP). A figura 19 mostra a variação da expressão dos 6 melhores genes GAPDH, UBE2, UB e 60S em resposta ao cultivo das plântulas controle e (GA₃ 0,5 mg.L⁻¹ e PBZ 0,05mg.L⁻¹).



Figura 19. Variação de resposta dos genes eEF 1α, ATP, 60S, UBQ10, Act 11 e UB ao cultivo *in vitro* em meio MS, GA₃ 0,5 mg.L⁻¹ e PBZ 0,05 mg.L⁻¹. No eixo das abscissas temos os 3 experimentos distintos testados: C (experimento controle); P (experimento tratado com paclobutrazol); GA₃ (experimento tratado com GA₃ 0,5 mg.L⁻¹). No eixo das ordenadas temos o valor CT obtido para cada um dos normalizadores utilizados em resposta aos diversos tratamentos.

Como podemos visualizar na figura 20, nenhum dos genes apresentou uma expressão estável em todas as condições (tratamentos), portanto eles não podem ser considerados normalizadores perfeitos, no entanto foi escolhida a ubiquitina (UB) de cana-de-açúcar e o domínio de fator de elongação Tu GTP (eEF 1α), já que foram os genes que apresentaram a expressão menos variável nos tratamentos realizados.

Adicionalmente, após as reações de PCR em tempo real, são geradas para cada uma das reações, curvas de dissociação, sendo que a especificidade do produto de PCR gerado é averiguada pela existência de um único pico nas curvas obtidas, sugerindo a existência de um único produto de amplificação (figura 20).



Figura 20. Curva de dissociação do gene da Ubiquitina (UB), mostrando apenas um pico de amplificação, o que sugere especificidade.

3.9.9 Catálogo SUCAST

O catálogo SUCAST pode ser encontrado nos trabalhos de SOUZA *et al.*, 2001 e PAPINI-TERZI *et al.*, 2005. Partindo-se das seqüências geradas pelo Projeto SUCEST (VETTORE et al., 2001) foram catalogados os SAS de cana-de-açúcar possivelmente relacionados com transdução de sinais por similaridade com outras seqüências já categorizadas e utilizando-se a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Para isso, seqüências de outros organismos relacionados a componentes de transdução de sinais, como receptores, adaptadores, proteínas G, pequenas GTPases, membros do sistema de duplo-componente, proteínas quinases, proteínas fosfatases e elementos da maquinaria de ubiquitinação foram selecionados para as buscas por BLAST contra o banco SUCEST. Aproximadamente 1500 SAS codificando para proteínas de transdução de sinais foram catalogadas no SUCAST (ww.sucest-fun.org). Uma breve descrição dos genes-alvos para nosso trabalho encontra-se no anexo 6.

4. Resultados

4.1 Influência do GA₃ no metabolismo de carboidratos e na partição de carbono em plântulas de cana-de-açúcar.

Em relação os teores de açúcares solúveis totais (AST) e redutores (AR), podemos observar na tabela 3, que já aos 7 dias de tratamento, quando comparamos plantas controles e plantas tratadas com GA₃ ocorreu um aumento significativo de AST nas tratadas. Observamos também que plântulas tratadas com GA₃ 5 e GA₃ 20 mg.L⁻¹ não diferem estatisticamente entre si (exceto aos 28 dias) no acúmulo desses açúcares, inclusive aos 7 dias de tratamento e aos 21 dias, o tratamento GA_3 5, tem valores absolutos maiores que o tratamento com 20 mg.L⁻¹. Quando avaliamos separadamente cada tratamento ao longo dos 28 dias, os AST aumentam gradativamente nesse período, mas de forma tênue, havendo um aumento expressivo nesses teores no intervalo de tempo entre 7 e 28 dias dos tratamentos GA_3 0,5 e GA_3 20 mg.L⁻¹, mostrando dessa forma que a medida em que as plântulas se desenvolvem (aumentam os dias de tratamento), ocorre o acúmulo desses carboidratos. Em relação aos AR, quando são comparados às plântulas controles com os tratamentos contendo GA₃ os dados mostram que aos 7 dias de tratamento, ocorreu um acentuado aumento nesses teores em relação ao controle e as diferentes concentrações de GA₃, no entanto as plântulas tratadas com GA₃ 5 e GA₃ 20 mg.L⁻¹ não diferem estatisticamente entre si, o mesmo visto nos dados de AST. Aos 14 dias observamos valores bem próximos aos vistos no inicio do tratamento, com uma discreta redução dos teores de AR nas plântulas tratadas com GA₃, já aos 21 dias ocorreu uma diminuição nos teores de AR, sendo drástica nas plântulas controles. E finalmente aos 28 dias observamos uma recuperação nesses teores semelhante aos níveis vistos aos 7 dias de tratamento (exceto em $GA_3 5 mg.L^{-1}$).

Tabela 3. Teores de açúcares solúveis totais e redutores da parte aérea de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* submetidas a diferentes concentrações de GA₃. A análise estatística foi feita de forma global dentro do mesmo tipo de açúcar (letra minúscula para análise dos açúcares solúveis totais e letra maiúsculas para análises dos açúcares redutores). A análise estatística utilizada foi Anova one-way (n=mix de 50 plantas; 3 repetições). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \le 5\%$).

TEORES DE AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS (mg.g ⁻¹ FW) (AST)					
Tempo de coleta	7	14	21	28 (dias)	
	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		
Controle	92,14 ± 0,69 g	106,37 ± 7,0 fg	98,24 ± 4,59 g	91,42 ± 0,46 g	
$GA_3 0,5 mg.L^{-1}$	124,51 ± 1,0 ef	132,75 ± 1,2 de	141,58 ± 1,0 de	150,70 ± 0,7 cd	
$GA_3 5 mg.L^{-1}$	177,21 ± 1,15 b	179 ± 1,0 b	182,15 ± 1,15 b	184,20 ± 0,79 b	
$GA_{3} 20 \text{ mg.L}^{-1}$	172.73 ± 3.48 bc	181.33 ± 14.19 b	175.37 ± 4.26 bc	210.45 ± 1.0 a	

TEORES DE AÇÚCARES REDUTORES (mg.g⁻¹FW) (AR)

Tempo de coleta	7	.14	21	28 (dias)
Controle	82,61 ± 0,9 EF	90,90 ± 6,28 DEF	61,6 ± 3,27 G	83,61 ± 1,82 EF
GA ₃ 0,5 mg.L-1	110,55 ± 1,19 BCD	102,22 ± 1,78 CDE	94,35 ± 2,46 DEF	104,50 ± 0,5 CD
GA ₃ 5 mg.L-1	136,56 ± 1,59 A	127,07 ± 2,07 AB	119,48 ± 0,67 ABC	80,16 ± 4,9 FG
GA ₃ 20 mg.L-1	133,57 ± 2,15 A	127,90 ± 9,56 AB	108,69 ± 2 BCD	136,71 ± 0,64 A

Na figura 21 observamos que em todos os tratamentos, ocorreu um aumento no teor de sacarose até os 21 dias de tratamento. Nas plântulas controle entre 21 e 28 dias de tratamento ocorreu um decréscimo nesse acúmulo, a redução foi bastante expressiva, retomando os valores vistos aos 7 dias de tratamento. Quando avaliamos os tratamentos $GA_3 0,5$ e $GA_3 20$ e mg.L⁻¹, vimos que os teores se sacarose aumentaram significativamente até 21 dias, após esse período,

as concentrações se mantiveram praticamente estáveis. No tratamento $GA_3 5 mg.L^{-1}$ observamos que durante os 28 dias de tratamento a sacarose continuou sendo acumulada de forma expressiva. Quando avaliamos os diferentes tratamentos ao longo do tempo, vimos que a partir dos 7 dias de tratamento os índices de sacarose do controle são sempre inferiores aos das plântulas tratadas com GA₃, entre as as plântulas tratadas com GA₃, os teores de sacarose na concentração 0,5 mg.L⁻¹, foi sempre inferior aos demais tratamentos com GA₃, já quando comparamos os tratamentos GA₃ 5 e GA₃ 20 mg.L⁻¹, fica evidente aos 28 dias de tratamento que a concentração 20 mg.L⁻¹ não faz mais um efeito somatório nessas plântulas, já que o tratamento 5 mg.L⁻¹, apresentou uma continuidade quanto ao acúmulo de sacarose, sugerindo uma saturação causada pelo excesso de GA₃ utilizado nas plântulas.



Figura 21. Teores de sacarose da parte aérea de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* submetidas a diferentes concentrações de GA₃ ao longo de 28 dias de tratamento. A estatística foi feita de forma global. Os dados de sacarose foram obtidos a partir da subtração dos AST e dos açúcares redutores da tabela anterior. A análise estatística utilizada foi Anova one-way (n=mix de 20 plantas; 3 repetições). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \le 5\%$).

A relação fonte: dreno das plantas pode ser estimada através de medidas da razão entre os níveis de sacarose e de monossacarídeos (frutose e glucose) encontrada nos tecidos. Assume-se que quanto maior o valor absoluto dessa razão (e maior que um), maior é a tendência de um funcionamento do tecido vegetal como fonte, ou seja, sua taxa fotossintética seria maior que sua taxa respiratória. Este tipo de análise é mostrado na figura 22, onde pode-se observar que em todos os tratamentos, a medida em que as plântulas se desenvolvem, maior é essa razão. No caso GA₃ independentemente de plântulas tratadas com da concentração razão а sacarose:monossacarídeos aumentou, significativamente mais do que no controle sem o hormônio.

Relação fonte:dreno da parte aérea 2.4 GA₀0,5 mg.L Controle 2.1 GA_20 mg.I Sacarose.monossacarídeos⁻¹ $GA_5 mg.L^{-1}$ 1.8 1.5 1.2 0.9 0.6 0.3 0.0 7 21 28 14 Tempo de tratamento (dias)

Figura 22. Razão entre sacarose/monossacarídeos(frutose e glucose) em plântulas de canade-açúcar cultivadas *in vitro* em meio MS submetidas a diferentes concentrações de GA₃. A análise estatística foi feita de forma global. A análise estatística utilizada foi Anova oneway (n=mix de 20 plantas; 3 repetições). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \le 5\%$).
4.2 Influência de diferentes concentrações de GA₃, de PBZ na incorporação de massa fresca e partição de carbono em plântulas de cana-de-açúcar em relação ao tempo de tratamento.

Foram avaliados o desenvolvimento morfológico e a incorporação de massa fresca em plântulas cultivadas in vitro em diferentes concentrações de GA₃ (0,5 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹ e 20 $mg.L^{-1}$), na presença de PBZ (0,05 $mg.L^{-1}$) e nas plântulas controles, em diferentes intervalos de tempo (7,14, 21 e 28 dias). De acordo com a tabela 3, que mostra a diferença na incorporação de massa fresca, plântulas tratadas com PBZ 0,05 mg.L⁻¹ tiveram um ganho de massa comprometido em relação a todos os tratamentos com GA₃ ao longo de todos os dias (7, 14, 21 e 28), e também em relação ao controle a partir de 21 dias de tratamento. Quando observamos as plântulas tratadas com GA₃ 0,5 mg.L⁻¹, vimos que quando comparadas ao controle ocorre uma tendência de aumento na massa fresca em valores absolutos, mas isso só se torna significativo a partir de 21 dias de tratamento. Quando comparamos os tratamentos GA₃ 5 mg.L⁻¹e GA₃ 20 mg.L⁻¹ vimos que no segundo tratamento parece não haver uma resposta efetiva em relação incorporação de massa fresca, pois os valores são semelhantes ao do tratamento GA₃ 5 mg.L⁻¹ em todos os dias. De maneira geral, podemos dizer que aos 21 dias de tratamento, em todas as concentrações de GA₃ utilizadas, assim como considerando também o PBZ e o controle, a incorporação de massa fresca foi diferenciada, sugerindo que com essa idade a planta responde melhor às condições experimentais esperadas.

Observando ainda os dados da tabela 4, em relação ao comprimento da parte aérea, vimos que as plântulas tratadas com PBZ $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ tiverem seu crescimento da parte aérea totalmente comprometido, e em relação ao GA₃, de forma geral quanto maior a concentração de GA₃, maior o comprimento da plântula ao longo do tempo.

Tabela 4. Alometria de plântulas de cana-de-açúcar coletadas em diferentes intervalos de tempo, cultivadas *in vitro* em meio MS, na presença de PBZ 0,05mg.L⁻¹ e diferentes concentrações de GA₃. A análise estatística utilizada foi Anova one-way entre os diferentes parâmetros: letra minúscula para as análises realizadas na massa fresca e maiúsculas para o comprimento da parte aérea. n=mix de 20 plantas; 3 repetições. Médias assinaladas com letras diferentes diferentes significativamente pelo teste de Tukey ($P \le 5\%$).

	Ν	IASSA FRESCA ((mg)	
Tempo de coleta (dias)	7	14	21	28
Controle	$3,45 \pm 0,05$ kl	5,75 ± 0,25 ijkl	$10 \pm 0.02 \text{ fg}$	17,5 ± 0,5 cd
Paclobutrazol	2,1 ± 0,02 l	4 ± 0,02 kl	6 ± 0,01 hijkl	11 ± 0,02 efg
GA ₃ 0,5 mg.L ⁻¹	4,7 ± 0,05 jkl	7 ± 0,02 ghijk	13,5 ± 0,5 de	18,5 ± 1,5 bc
$GA_3 5 mg.L^{-1}$	6,9 ± 0,1 ghijk	9 ± 0,01 ghi	23,5 ± 0,5 a	25,5 ± 2,5 a
GA ₃ 20 mg.L ⁻¹	8,1 ± 0,05 ghij	9 ± 0,02 ghi	15 ± 0,02 cde	22 ± 1,0 ab
	COMPR	IMENTO TOTAI	L DA PARTE AÉ	EREA (cm)
Tempo de coleta	7	14	21	28
(dias) Controle	1,5 ± 0,02 K	2 ± 0,01 J	$4 \pm 0 \mathbf{F}$	5,75 ± 0,05 D
Paclobutrazol	0,3 ± 0,01 M	$1 \pm 0,01$ L	$2 \pm 0.02 \text{ J}$	$3 \pm 0,01$ H
GA ₃ 0,5 mg.L-1	$2,5 \pm 0,01$ I	$4,5 \pm 0,02 \text{ E}$	5,75 ± 0,25 D	7,25 ± 0,25 B
GA ₃ 5 mg.L-1	3,5 ± 0,02 G	$4,5 \pm 0,02 \text{ E}$	6,5 ± 0,5 C	7,65 ± 0,15 B
GA ₃ 20 mg.L-1	$3,5 \pm 0,02$ G	6,5 ± 0,01 C	9,0 ± 0,02 A	$9,1 \pm 0,02$ A

Na figura 23 podemos observar a diferença no crescimento entre o tratamento controle e as plântulas tratadas com PBZ 0,05 mg.L⁻¹ (A), e na figura (B) vemos a diferença entre as plântulas

- · - · - · -

controle e as tratadas com diferentes concentrações de GA₃. Em ambos os casos foram



Figura 23. Plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro*. (A) diferença entre plântulas controle e tratadas com PBZ 0,05 mg.L⁻¹ e (B) mostra a diferença no alongamento de épicotilos das plântulas controle e as tratadas com diferentes concentrações de GA₃. 0,5 = plântulas tratada com GA₃ 0,5 mg.L⁻¹; 5 = plântulas tratada com GA₃ 5 mg.L⁻¹ e 20= plântulas tratada com GA₃ 20 mg.L⁻¹

Na figura 24 temos uma secção de cortes histológicos longitudinais das plântulas controles, tratadas com GA₃ e PBZ. Podemos notar que comparando as plântulas com 7 dias de tratamento, em A (controle), B (PBZ), C e D (GA₃), notamos que a principal diferença entre eles, ocorre no alongamento (na base do meristema, na região meristemática, nos primórdios foliares) e no número de divisões celulares (principalmente no meristema) e formação de vacúolos. Em E, F, G e H, temos um corte com maior aumento visualizando principalmente as divisões mitóticas e formação de vacúolos. Em I, J, K e L, temos plântulas controle e tratadas com GA₃ 0,5 mg.L⁻¹ com 14 dias de tratamento, respectivamente. J e L, detalhes do MA e PF no controle (com divisão celular e formação de vacúolos) e em L, detalhes do alogamento celular.



Figura 24.1 Secção de cortes histológicos longitudinais das plântulas controle, tratadas com GA₃ 0,5 mg. L⁻¹ e PBZ com 7 dias de tratamento. As setas mostram as estruturas citadas na legeda. A e B, temos: meristema apical (MA) e primórdios foliares (PF) (5x), em plântulas controle e com PBZ, respectivamente. Em C, temos região basal do epicótilo (abaixo do MA) e em D, temos: meristema apical do caule (MAC) e primórdios foliares (PF) de plântulas tratadas com GA₃ com 7 dias de tratamento (5x).



Figura 24.2 Secção de cortes histológicos longitudinais das plântulas controle, com PBZ e com GA₃0,5 mg.L⁻¹ e PBZ com 7 dias de tratamento. E, F. temos: detalhes do MA e PF. G. Detalhes do alogamento celular do epicótilo e H. Detalhes do MA e PF com céulas em divisão e formação de vacúolos. Os círculos mostram o processo de divisão celular e formação de vacúolo, em plântulas controle, com PBZ e GA₃, respectivamente (20x).



24.3 Secção de cortes histológicos longitudinais das plântulas controle e tratadas com GA₃ 0,5 mg. L⁻¹ com 14 dias de tratamento. I. MA e PF de plântula controle, observar a reduzida quantidade de células na região basal (5x); J. detalhes do MAC e PF com região contendo numerosos vacúolos (20x). K,L. região intercalar do meristema apical tratadas com GA₃ (5x e 20x, respectivamente).

Na tabela 5 podemos observar a média do tamanho das células a partir dos cortes histológicos em plântulas controle, tratadas com GA₃ 0,5 mg.L⁻¹ e PBZ com 7 dias de tratamento. A análise estatística utilizada foi Anova one-way entre os diferentes parâmetros: letra minúscula para as análises realizadas no comprimento e maiúsculas para a largura. n=mix de 20 plantas; 3 repetições. Médias assinaladas com letras diferentes diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \le 5\%$).

tra <u>tamento.</u> N	fedidas das células (µm)		
Tratamento	comprimento	largura	
Controle	8,6 b	5,1 B	
PBZ	6,5 c	7,7 A	
GA ₃ 0,5 mg.L ⁻¹	23,3 a	4,0 C	

Tabela 5. Média do comprimento e largura de células das plântulas com 7 dias de tratamento.

Foi avaliada a partição entre raiz e parte aérea (figura 25) das plântulas submetidas a todos os tratamentos ao longo dos 28 dias e os dados são apresentados em percentagem (%), o gráfico só mostra os valores correspondentes a parte aérea. Podemos observar que as plântulas tratadas com PBZ 0,05 mg.L⁻¹ tiveram um investimento muito maior no desenvolvimento do sistema radicular do que na parte aérea que só chegou a 40%. Nas plântulas controles, vimos que a proporção da parte aérea variou pouco ao longo do tempo se mantendo em valores próximos a 50%, e por último podemos dizer que quanto maior a concentração do GA₃, maior é o crescimento da parte aérea, embora essas diferenças não sejam significativas entre as concentrações de GA₃.

Foi observado que o alongamento da parte aérea apresentou uma região diretamente afetada após a aplicação de GA₃, que foi categorizada como uma região estiolada, o epicótilo.

E essa região se apresentou mais ou menos alongada de acordo com o tratamento realizado, e no caso da aplicação de PBZ 0,05 mg.L⁻¹, o seu surgimento foi totalmente reprimido ao longo dos 28 dias de tratamento (figura 26).



Figura 25. Relação da proporção de RAIZ:PARTE AÉREA (%) de plântulas de canade-açúcar cultivadas *in vitro* submetidas ao PBZ 0,05mg.L⁻¹ e diferentes concentrações de GA₃ coletadas em diferentes intervalos de tempo. A análise estatística utilizada foi Anova one-way (n=mix de 20 plantas; 3 repetições). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \le 5\%$).

Parte aérea



Figura 26. Crescimento do epicótilo de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* submetidas ao PBZ 0,05 mg.L⁻¹ e diferentes concentrações de GA₃ coletadas em diferentes intervalos de tempo. A análise estatística utilizada foi Anova one-way (n=mix de 20 plantas; 3 repetições). Médias assinaladas com letras diferentes diferente

Observando a figura 27 e anexo 7, de acordo com a composição de monossacarídeos da parede celular das plântulas (cap. 1), de maneira geral a análise da parte aérea resultou em uma predominância dos polissacarídeos compostos por xilose, arabinose, glucose e galactose provavelmente originário de pectinas. A glucose pode ser proveniente da solubilização do β-glucano, e a grande quantidade de xilose e arabinose seria justificada pela formação do arabinoxilano. A galactose, juntamente com uma fração da arabinose, possivelmente vem de pectinas. Quando olhamos detalhadamente os tratamentos, vimos que a utilização do GA₃, assim como o PBZ 0,05 mg.L⁻¹, pareceram não interferir na composição da parede celular dessas plântulas uma vez que os teores dos polissacarídeos se mantiveram muito semelhantes aos das plântulas controle.

Ainda que não se tenha observado diferenças na composição dos monossacarídeos de parede celular com os tratamentos com GA₃ e com o PBZ, uma observação importante foi que há um aumento gradativo de xilose e arabinose em detrimento da glucose ao longo dos 21 dias de experimento. Esta observação sugere que há deposição diferencial de uma das hemiceluloses (arabinoxilano) durante o desenvolvimento inicial das plântulas de cana-de-açúcar, não sendo este mecanismo afetado pelo metabolismo de giberelinas.



Figura 27. Composição dos monossacarídeos neutros da fração total da parede celular da parte aérea de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* na presença de PBZ 0,05mg.L⁻¹ e diferentes concentrações de GA₃ em diferentes dias de coleta. A análise estatística foi feita de forma global entre os mesmos monossacarídeos. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \le 5\%$). As letras maiúsculas e minúsculas foram utilizadas para ajudar a diferenciar o tipo de açúcar no qual foi feita a análise estatística.

4.3 Influência do GA₃ 0,5 mg.L⁻¹ e do PBZ na expressão gênica de plântulas de cana-deacúcar após 21 dias de tratamento.

Da tabela 6A até a 6G, são apresentados os resultados de expressão diferencial sob tratamento com GA₃ e com paclobutrazol de genes agrupados segundo categorias às quais estes foram classificados de acordo com o banco SUCEST. Nas tabelas são mostrados também os respectivos SAS e número de acesso pelo Gene Bank de cada gene. As tabelas ilustram nas últimas duas colunas os valores de expressão gênica obtidos a partir da metodologia de LIVAK & SCHMITTGEN (2001), descrito no Material e Métodos, que foram transformados em LOG de 2. Consideramos (+) como os genes que foram induzidos e (-) como os que foram reprimidos. Para um breve descrição das funções e características dos genes estudados, ver anexo 6.

Na tabela 6A, observamos em ambos os tratamentos a indução de genes envolvidos com a biossíntese (1) e a via de transdução de sinal (3) das AUX; somente no tratamento com GA₃, foi induzido um gene que codifica a proteína DELLA (4); já no tratamento com PBZ foram induzidos genes da via de transdução de sinal do ABA (2), do ácido jasmônico (7), e da biossíntese do etileno (17). Todos os demais genes foram reprimidos em ambos os tratamentos.

	SAS/Cono Bonk				Exp	ressão
	SAS/Gene Dank	Categoria	Sub-categoria 1	Sub-categoria 2	GA ₃	PBZ
1	SCEQRT1028H06.g			Nitrilase		
	<u>NM_001112112.1</u>	Biossíntese hormonal	AUX	(E.C.3.5.5.1)	+ 3	+ 5
2	SCSFRT2068D12.g		Resposta a	ASR (Absicic stress		
	<u>NM 001154231.1</u>	Resposta a estresse	estresse	ripening)	- 0,5	+ 0,4
3	SCCCRZ1001G10.g		Relação com	AUX (proteina		
	<u>NM 001157154.1</u>	TF	Aux/AIA	IAA16)	+1	+ 0,3
4	SCEQLR1050D04.g		Envolvida no			
	DQ062091	TF da famíla GRAS	desenvolvimento	Similar ao GAI	+ 0,5	- 1,4
5				AUX 1 (promotor		
	SCSGST3121C06.g		Adaptador	de cresc. AUX-		
	<u>NM 001111676.1</u>	desenvolvimento	transcricional	independente)	- 1,3	- 1,2
6	SCEZHR1047G06.g					
	NP_001105582.1	Biossíntese hormonal	Auxina	Nitrilase (E.C.5.5.1)	- 0,7	- 1,3

Tabela 6A. Genes relacionados com a biossíntese hormonal e via de transdução de sinais

7	SCCCRT1001E01.g			Lipoxygenase (E.C.		
	<u>NM 001111533.1</u>	Biossíntese hormonal	Ác.jasmônico	1.13.11.12)	- 2	+ 0,7
8	SCRLLR1038H01.g			Monooxygenase		
	<u>NM 001157971.1</u>	Biossíntese hormonal	Ác.abscísico	(E.C.14.13)	- 1,6	- 0,3
9	SCBGLR1002A01.g			Éster carboxílico		
	NP_001055520.1	Receptor de GA (GID1)	GA	(E.C. 3.1.1)	- 0,9	- 0,8
10	SCMCCI (052 A05 -			Proteína		
	SCMCCL6053A05.g			SCARECROW		
	XM_002456575	TF	GRAS	(SCR)	- 2,4	- 1,5
11				domínio: Cyclin-		
	SCVPFL3044C07.g	Regulador positivo de	F-box protein	like F-box		
	NM 001155936.1	GA (SLY1)	GID2		- 1,5	- 1,6
12	SCCCRZ2003D01.g			Transdução de sinal		
	NP_001044771.1	Sinalizador de GA	XERICO	(RING-H2 finger)	- 1	- 1,3
13				2OG-Fe(II)		
				superfamília		
	SCSFRT2070A10.g			oxygenase		
	NP_001151167.1	Biossíntese hormonal	GA20-oxidase	(E.C.1.14.11-)	- 2,3	- 1,7
14	SCSGLR1025A04.g			giberelina 20-		
	XP_002463483.1	Biossíntese hormonal	GA20-oxidase	oxidase	- 5	- 1,8
15	SCBGLR1002A09.g	TF responsivo a estresse		Protein responsiva	- 2,4	- 1,2
	XM_002460092.1	de seca	Etileno	ao etileno		
16	SCJFRT1005C11.g			ACC oxidase		
	XP_002467643.1	Biossíntese hormonal	Etileno	(E.C.1.14.17.4)	- 2,4	- 4,1
17	SCQGAM2028D11.g			ACC synthase		
	<u>XM_002454974.1</u>	Biossíntese hormonal	Etileno	(E.C.4.4.1.14)	- 5,5	+ 1,2
18				2-Oxoglutarate-		
				dependent		
	SCCCCL2001D09.b			dioxygenase((EC:1.		
	XM_002446116.1	Biossíntese hormonal	Etileno	14.11.2)	0,7	- 5

Na tabela 6b, observamos em ambos os tratamentos ocorreu a indução de gene (22), que está envolvido com a formação de meristema apical, crescimento e senescência. Apenas no tratamento com GA₃ houve a indução do gene (19) que esta envolvido em processos como proliferação celular e diferenciação, além do alongamento celular e germinação. Todos dos outros fatores de transcrição (FT) foram reprimidos tanto no tratamento com GA₃ quanto com PBZ.

					Even	20020
	SAS/Acesso do				Expr	essao
	Gene Bank	Categoria	Sub-categoria 1	Sub-categoria 2	GA ₃	PBZ
	SCCCRZ1001H05.g		HLH (helix-		+ 0,3	0
19	NM_001156600.1	TF	loop-helix)	TF bHLH		
	SCRURT2010A10.g	TF			- 3,2	- 0,9
20	XM_002440514.1		MYB	TF myb		
	SCEPLB1042D02.g	TF	NAM (no apical		- 0,6	- 0,9
21	<u>XM 002444531.1</u>		meristem)	Proteína NAC2		
22	SCCCLR2003E10.g	TF	NAM (no apical	FT NAC / Proteína	+ 1	+ 1,8

Tabela 6B. Fatores de transcrição

	XM_002466172.1		meristem)	GRAB2 (Geminivirus Rep		
				A-binding)		
		TF		Protein homeótica floral		
	SCQGLR1085G10.g			APETALA1		
	XM 002460944.1			(AP1)/Agamous-like		
23			MADS	protein MADS box (AGL7)	- 1	- 1
	SCSBFL1039F08.g	TF	NAM (no apical	YZ1 (CBS domain-		
24	XM 002455969.1		meristem)	containing protein)	- 3,8	- 4
	SCBFAD1046D01.g	TF	HLH (helix-			
25	XM 002448267.1		loop-helix)	b1-1	- 4,2	- 2,3
	SCAGLR1021G10.g	TF				
26	XM 002463907.1		homeobox	Homedomínio KNOTTED1	- 1	- 2,3
	SCCCLR1C04F11.g	TF				
27	<u>XM 002442153.1</u>		WRKY	zinc finger TF WRKY1	- 6,5	- 3,2

Na tabela 6C, podemos observar que o gene (28), que está relacionado com o processo de senescência foi induzido em ambos os tratamento e somente no tratamento com GA₃ o gene (29) que tem relação com o metabolismo de ácidos nucléicos foi induzido. Os demais genes foram reprimidos em ambos os tratamentos.

	SAS/Acesso do Gene				Expr	essão
	Bank	Categoria	Sub-categoria 1	Sub-categoria 2	GA ₃	PBZ
	SCQGLV1016A04.g	Metabolismo de	Catabolismo de	proteína nuclease I	+ 0,2	+ 0,12
28	NM_001130119.1	ácidos nucléicos	DNA	(EC 3.1.30.1)		
			Regulacao de		+ 0,55	- 0,1
	SCEZLB1007F08.g	Metabolismo de	transcrição, DNA-			
29	XM_002456921	ácidos nucléicos	dependent	Histone H2B.4		
				DNA-damage-	- 3,8	- 2,8
		Resposta a estresse		repair/protein		
	SCSFLR2009F02.g			tolerante DRT102		
30	NM_001049807.1		Reparo de DNA	(EC 5.4.2.3)		
	SCJLRT1016G06.g			Ribonuclease	- 1,8	- 2,5
31	XM 002445504.1	Resposta a estresse	wound-induced	T2(EC:3.1.27.1)		
	SCJLHR1028C12.g	Metabolismo de			- 1,2	- 2,2
32	XM 002462758.1	DNA	histona	Histona H4		

Tabela 6C. Genes relacionados com o ciclo celular

A tabela 6D, mostra os genes envolvidos com o metabolismo da parede celular, e é possível verificar que os genes (34, 35), que estão envolvidos com a expansão da parede foram induzidos tanto no tratamento com GA₃ como no tratamento com PBZ. No tratamento com

GA₃, o gene (37) também foi discretamente induzido e está relacionado com a extensão da parede celular. O gene (33), que tem relação com deposição de lignina só foi induzido no tratamento com PBZ. Todos os outros genes foram reprimidos.

	SAS/Acesso do Gene				Expr	essão
	Bank	Categoria	Sub-categoria 1	Sub-categoria 2	GA ₃	PBZ
33	SCEQRT1024E12.g	Metabolismo de			- 0,2	+ 1,3
	NM_001158010.1	carboidratos	Parede celular	PAL (E.C.4.3.1.5)		
	SCBFLR1039B05.g	Metabolismo de		XET (EC:2.4.1.207)		
34	XM 002437473.1	carboidratos	Parede celular		+ 1	+ 2,2
				XTHs (EC		
	SCBFLR1046C09.g	Metabolismo de		2.4.1.207 e/ou		
35	<u>NP 001105166.1</u>	carboidratos	Parede celular	E.C.3.2.1.151)	+ 1	+ 0,7
	SCAGLR1064F05.g	Metabolismo de		glicosiltransferase(E		
36	<u>XM 002466092.1</u>	carboidratos	cellulose synthase 7	.C.2.4.1.12)	- 0,2	+ 2,3
	SCJLLR1033E07.g					
37	XM_002467457.1	Parede celular	beta-expansin 8	Proteína estrutural	+ 0,1	- 0,12
	SCCCRZ2002G07.g	Metabolismo de	Provável celulose	(glicosiltransferase)		
38	NM_001111487.1	carboidratos	sintase 7[Z.mays]	E.C.2.4.1.12	- 2,1	- 0,4
	SCCCLR2C02A05.g	Proteína da				
39	NP_001105040.1	parede celular	alpha expansin1	Proteína estrutural	- 2,1	- 0,3
	SCQGRT1040G03.g	Proteína da	Precursor da alpha-			
40	XM_002451877.1	parede celular	expansin 11	Proteína estrutural	- 9,2	- 10,5
	SCJFLR1013H10.g		UDP-6-			
41	XM 002468250.1	Parede celular	desidrogenase	EC:1.1.1.22	- 1,5	- 0,92

Tabela 6D. Genes relacionados com a parede celular

Na tabela 6E, podemos observar a indução de diversos genes envolvidos com a fotossíntese (42, 43, 44), com a fixação de carbono (45, 46) em ambos os tratamentos. O tratamento com PBZ também induziu os gens (48, 49). Os demais genes foram reprimidos em ambos os tratamentos.

Tabela 6E. Genes relacionados com a fotossíntese

					Expr	essão
	SAS	Categoria	Sub-categoria 1	Sub-categoria 2	GA ₃	PBZ
		Metabolismo de	chlorophyla a/b	Complexo LHC	+ 0,5	+ 1,6
	SCSBST3096E08.g	carboidratos	binding protein	(light-harvesting		
42	XM 002460811.1		(CAB)	complex)		
		Metabolismo de		Complexo LHC	+ 0,8	+ 3
	SCJFLR1074A11.g	carboidratos	clorofila a/b binding	(light-harvesting		
43	XM 002460577.1		proteina (CAB)	complex)		
	SCRULR1020D09.g	Metabolismo de	Ciclo do citrato (TCA		+ 0,85	+ 2
44	XM 002438476.1	carboidratos	cycle) e C4	PEPC (E.C 4.1.1.31)		
45	SCVPRT2075C09.g	Metabolismo de	Fixação de carbono	Piruvato.ortofosfato	+ 0,5	+ 1,2

	NP_001105738.1	carboidratos		dikinase EC 2.7.9.1		
46	SCCCRZ1001B08.g XM_002455155.1	Metabolismo de carboidratos	Fixação de carbono	Triose phosphate isomerase citosólica (EC 5.3.1.1)	+ 2,4	+ 0,2
47	SCACLR2007B05.g XM_002447267.1	Metabolismo de carboidratos	chlorophyla a/b binding protein (CAB)	Ccomplexo LHC (light-harvesting complex)	+ 0,2	- 0,7
48	SCCCCL3001A05.g XM_002445129.1	Metabolismo de carboidratos	Ciclo do citrato (TCA cycle)	Aconitate hydratase citoplasmática EC 4.2.1.3	- 0,4	+ 1,3
49	SCEQLB1063G04.g NM_001157959.1	Fotossíntese	Anidrase carbônica	E.C. <u>4.2.1.1</u>	- 0,2	+ 0,6
50	SCACLR1129A11.g NM_001072866.1	fotossintese	Photosystem I reaction centre subunit N, chloroplast precursor (PSI-N)	Water stress repressed	- 2,2	- 1,8
51	SCSBSD2029H02.g XM_002443659.1	bioenergética	Ferredoxin-1, chloroplastic; Ferredoxin I; Fd I;	sp P27787 FER1_MA IZE Ferredoxin I, chloroplast precursor (Fd I) pir T03286 ferredoxin [2Fe-2S] - maize gb AAA33459.1	- 0,4	- 0,72

De acordo com a tabela 6F, podemos verificar que vários genes da via glicolítica (52, 53), quinases (55, 56, 58, 59) foram responsivos aos tratamentos com GA₃ e PBZ, ainda podemos observar que o gene (65), que tem função relacionada com fixação de carbono foi induzido tanto na presença de GA₃ quanto de PBZ. Já o gene (64) só foi induzido na presença de PBZ. O restante dos genes foi reprmido tanto no tratamento com GA₃ quanto como PBZ.

Tabela 6F. Genes relacionados com o metabolismo de carboidratos

					Expr	essão
	SAS	Categoria	Sub-categoria 1	Sub-categoria 2	GA ₃	PBZ
		Metabolismo de		Fructose-bisphosphate	+ 0,8	+ 0,55
	SCRULR1020D11.g	carboidratos		aldolase		
52	XM 002442848.1		glicólise	(EC:4.1.2.13)		
		Metabolismo de		Beta-D-	+ 0,8	+ 2,21
	SCAGLR1021F11.g	carboidratos	precursor 2 da beta-	glucosidase (EC		
53	XM_002462524.1		glucoesidase	3.2.1.21)		
	SCCCLB1004E10.g	Metabolismo de	Metabolismo de	beta-D-Glucosidase	+ 1	- 3,6
54	XM_002441984.1	carboidratos	amido e sacarose	EC 3.2.1.21		
	SCCCHR1003D05.g		MAPK/MAPKK/MA		- 0,5	+ 0,59
55	XM_002437483.1	Proteína quinase	PKKK	caneMAPK-3		
	SCCCLR1C05B07.g			similar to CIPK-like	+1	+ 1
56	XM 002465307.1	Proteína quinase	SNF-like kinases	protein 1		
	SCCCLB1003E11.g		Serine/Threonine		- 0,5	- 1,2
57	NP_001136496.1	Proteína quinase	protein kinases	caneREK-1		
	SCSGHR1070F12.g		Serine/Threonine		+ 2	+ 1,75
58	XM 002442656.1	Proteína quinase	protein kinases	CIPK03		

	SCJFRZ2032G01.g		Serine/Threonine		+ 1,8	+ 0,65
59	XM 002456241.1	Proteína quinase	protein kinases	KA1		
	SCCCRT1C06D06.g	Metabolismo de		Frutofuranosidase		- 4
60	<u>NM 001111899.1</u>	carboidratos	cell-wall invertase 1	(<u>3.2.1.26</u>)	- 6,3	
	SCACSB1117F03.g	Metabolismo de		glicosiltransferase		- 5
61	<u>XM 002465116.1</u>	carboidratos	sucrose synthase 1	(EC:2.4.1.13)	- 6,6	
	SCCCLR1001A05.g	Metabolismo de		glicosiltransferase		- 0,74
62	NM_001063582.1	carboidratos	sucrose synthase	(EC:2.4.1.13)	- 1,55	
	SCEQAM1036A06.g	Metabolismo de	sacarose phosphate	(EC:2.4.1.14)		
63	XM_002458946.1	carboidratos	synthase		- 6,1	- 3,2
		Metabolismo de		Trehalose-6-	- 1,8	+ 0,64
	SCCCCL4003E08.g	carboidratos	Metabolism de	phosphate synthase		
64	XM_002445441.1		trealose	(EC: 2.4.1.15)		
		Metabolismo de		Fructose-	+ 0,13	+ 0,64
		carboidratos		bisphosphatase		
	SCJLLR2020E06.g			Hexosediphosphatase		
65	NM_001157634.1		Fixação de carbono	EC 3.1.3.11		0.55
	SCSBSB105/E03.g	Metabolism de	Beta-glucosidase,	2.2.1.02	- 6	- 2,55
66	<u>NM_001049691.1</u>	carboidratos	putative	3.2.1.23	1.26	1.00
	0CCC0T100CD11		G ' //l '	caneOsmotic stress-	- 1,26	- 1,33
(7	SUCCS11000B11.g	Destaína quinasa	Serine/Inreonine-	activated protein		
07	<u>AWI_002433922.1</u>	Fiotenna quinase	protein kinase SAF K4	Killase-2	1.1	2.24
	SCEPP71000C10 g		Sarina/thraonina	activated protein	- 1,1	- 2,54
68	XM 002441114 1	Proteína quinase	protein kinase SAPKA	kinase_1		
00	<u>AWI 002441114.1</u>	Tioteina quinase	protein kinase SAT K4	canePKABA1-3	- 0.7	- 0.9
				(abscisic acid-	- 0,7	- 0,9
	SCRFLR1034G06 g		Serine/threonine-	inducible protein		
69	XM 002460996.1	Proteína quinase	protein kinase SAPK2	kinase)		
			F	canePKABA1-1	- 0.7	- 0.8
				(abscisic acid-	- , -	- , -
	SCACLR2007G02.g		Serine/threonine-	inducible protein		
70	XM_002460996.1	Proteína quinase	protein kinase SAPK2	kinase)		
			·	annaOsmotia strass	- 3,3	- 3,6
	SCCCST1004A07 g		Sarina/thraonina	activated protein		
71	XM 002441114 1	Drotoína quinasa	protoin kinoso SADVA	kinese 7		
/1	<u>AWI 002441114.1</u>	Fiotenna quinase	protein kinase SAFK4	KIIIase-7	2.4	1.5
					- 2,4	- 1,5
	SCCCCL3120C09.g		rLeceptor Ser/Thr			
72	XM_002445743.1	Receptor	kinase	caneRLK LysM-1		
					- 7	- 4
	SCBGFL5080E07.g		receptor Ser/Thr			
73	XM 002456792.1	Receptor	kinase	caneBRI1-6		

Na tabela 6G, temos uma maior variedade de genes que podem estar envolvidos com o metabolismo de carboidratos. O gene (74, 76, 78), foram induzidos no tratamento com GA₃ e com PBZ, e estão envolvidos com o transporte de proteínas, controle osmótico e processo de fosforilação, respectivamente. O tratamento com PBZ induziu também os genes (79 e 87), que tem relação com estresse e transporte de carboidratos. Os outros genes foram reprimidos em ambos os tratamentos.

Tabela 6G. Genes relacionados com diversas funções que influenciam o metabolismo de carboidratos

					Expressão	
	SAS	Categoria	Sub-categoria 1	Sub-categoria 2	GA ₃	PBZ
		-	-	similar to Heat shock	+ 0,6	+ 1,3
	SCCCRZ1002G01.g	Metabolismo	glucose-regulated	cognate 70 kDa protein		
74	XM_002442308.1	de carboidratos	protein	2		
			plasma		+ 1	- 1
	SCEQRT2100B02.g		membrane			
75	XM_002452438.1	Aquaporina	intrinsic protein2	MIP		
			Tonoplast		+ 0,3	+ 0,24
	SCCCRZ1001F02.g		intrinsic			
76	<u>XM_002465814.1</u>	Aquaporina	protein	TIP1-1		
	SCQGLR1085F11.g				+ 0,3	- 3
77	X15290.1	Estressse	drought-induced	deidrina		
		Proteina			+ 0,8	+ 1
	SCQGLR1085B04.g	fosfatase	subunidade			
78	<u>NM 001155214.1</u>	Ser/tre	catalítica PP2A-2			
	SCAGLR1043E04.g				- 2	+ 2,1
79	XP_002468237.1	estresse	cytochrome P450	(oxide synthase)		
	SCBGLR1023D05.g		superóxido	Zinc finger protein	- 1,8	- 1,65
80	XM_002445052.1	patogenicidade	dismutase (SOD)	(LSD1)		
	SCCCRZ2001C01.g	Resposta ao			- 1,9	- 10,7
81	XM_002452622.1	estresse	Tioredoxina	Thioredoxin h1 protein		
	SCRFLR2037F09.g	metabolsimo				
82	NP_001105712.1	de cálcio	calreticulin	CRT2 Calreticulin 2	- 1,9	- 1,65
	SCEZAM1080E11.g	Metabolismo	Ramificação de	Glicosiltransferase		
83	<u>XM 002437832.1</u>	de carboidratos	hemicelulose	(E.C.2.4.1.91)	- 5,9	- 6,7
				Regulador 1 pseudo-		
	SCEPLB1042B08.g	Desenvolvimen	Desenvolvimento	resposta PRR1(A.	- 3,2	- 1,55
84	XM_002452417.1	to		thaliana)		
				Proteína com dupla		
	SCEZHR1088E02.g	proteína		especifidade fosfatases	- 0,8	+ 1
85	<u>XM 002450177.1</u>	fosfatase	Tirosina fosfatase	(DSPP) EC3.1.3.16		
	SCEPRZ1010E06.g	Protein	serine/threonine		- 1,4	- 2,1
86	<u>XM 002441401.1</u>	fosfatase	PPM family	PP2C-like		
			Major facilitator	Transporte de		
	SCCCCL5004B03.g		superfamily	monossacarídeos 4	- 0,4	+ 0,3
87	XM_002465591.1	Transporte	(MFS)	[Oryza sativa (japonica		

5. DISCUSSÃO

5.1 Influência do GA₃ no metabolismo de carboidratos e na partição de carbono em plântulas de cana-de-açúcar.

O GA₃ vem sendo utilizado na agricultura há muitas décadas e diversos autores relatam o acúmulo de açúcares solúveis e sacarose, principalmente em órgãos fonte e nos frutos na sua presença. Em cana-de-acúcar, desde 1956 são citados o efeito benéfico do GA₃ no acúmulo de sacarose e retardamento do florescimento (MOORE et al,1986; CARVALHO, 1995; BANINASAB & MOBLI, 2008). Nossos dados mostraram claramente uma influência do GA₃ no acúmulo de AST (tabela 3) e sacarose (figura 21). Porém, a partir de uma determinada concentração de GA₃ (20 mg.L⁻¹) a planta não responde aumentando ainda mais suas concentrações de açúcares, sendo estes teores (AST, AR e sacarose) semelhantes a concentração de 5 mg.L⁻¹. Em alguns casos, geralmente a partir de 21 dias (dados que podem ser observados com relação aos AST e AR, na tabela 3), e aos 28 dias com bastante relevância, nos dados de sacarose, as plântulas respondem melhor ao tratamento com 5 mg.L⁻¹ ao invés do tratamento 20 mg.L⁻¹. Estes resultados sugerem que no decorrer do tempo, houve uma saturação dessa concentração na planta, causando provavelmente uma inibição dos processos metabólicos devido a alta concentração de GA as quais as plantas foram expostas. Esse efeito do GA já foi observado em outras plantas e em diversos tecidos vegetais (PINHEIRO et al, 2005; TANIMOTO, 2005).

Nas plantas, os tecidos podem funcionar como fontes ou como drenos de fotoassimilados. Geralmente folhas desenvolvidas funcionam como fontes, e os tecidos dreno, têm a capacidade de atrair fotossintetizados (KUIPER, 1993; PATRICK, 1997; ZHANG et al, 2007). É conhecido que os mais diversos sinais do desenvolvimento da planta, como por exemplo a presença de hormônios, entre eles as giberelinas, podem contribuir com a síntese de

carboidratos, alterando diretamente a relação fonte:dreno de um tecido. As giberelinas afetam a síntese de carboidratos, aumentando seus teores, principalmente nas folhas, que funcionam como um tecido fonte. Elas influenciam diretamente o transporte de fotoassimilados entre tecidos fonte e tecidos dreno, participam do controle de enzimas importantes no metabolismo de carboidratos (como as invertases) e influenciam o status de carboidratos em diversas espécies vegetais (CANO-MEDRANO & DARNELL, 1997; YIM et al, 1997).

Em nossos estudos, de forma geral, nas plântulas tratadas com diferentes concentrações de GA₃, quanto maior a concentração de GA₃, maiores foram os teores de AST, AR e sacarose (exceto na concentração 20 mg.L⁻¹), mostrando uma real interferência do hormônio nesse aspecto. É sabido que o acúmulo de hexoses acontece em virtude da ação de enzimas da parede celular (invertases), que convertem sacarose em frutose e glucose (ROISTSCH & GONZALEZ, 2004; ZHANG et al, 2007). Quando ocorre acúmulo de hexoses, é esperado que os teores de sacarose diminuam, em virtude da sua hidrólise nesse processo ou devido ao transporte da sacarose para armazenamento nos vacúolos dos tecidos dreno (KAUR et al, 2000; ZHANG et al, 2007). Nossos dados também mostraram que ocorreu aumento nos teores de sacarose, o que pode ser devido ao modelo experimental usado, onde toda a parte aérea foi considerada como um única amostra. As folhas, que são potenciais tecidos fonte e o epicótilo, que será diferenciado em colmo, é um potencial tecido dreno e o local onde a sacarose estaria sendo armazenada. Acredita-se que o GA₃ esteja contribuindo com o transporte de sacarose da folha para a região do epicótilo e permitindo o seu acúmulo, uma vez que o acúmulo de sacarose pode ocorrer na região tanto no dreno quanto nas folhas. Não podemos esquecer de considerar que ocorreu uma redução no número de transcritos da invertase da parede celular, mostrando dessa forma, que na circunstância estudada há de fato condições que propiciaram o acúmulo de sacarose, pois quando há pouca ação das invertase da parede, há o acúmulo de sacarose, em virtude não ocorrer a hidrólise da molécula em hexoses. Esse acúmulo também é corroborado quando observamos muitos dos genes envolvidos com a fotossíntese e fixação de carbono que foram induzidos, favorecendo mais uma vez o acúmulo de sacarose, que nos caso das plântulas tratadas com GA₃, pode ser explicado em virtude da demanda de energia necessária ao suprimento para o crescimento celular, por exemplo.

Os fitormônios têm um importante papel no transporte e alocação de fotoassimilados (PHILLIPS, 1975; PATRICK, 1976; GIFFORD & EVANS, 1981) e de acordo com BIALECKA & KEPCZYNSKI (2007), as GAs atuam diretamente nesse processo por favorecer o acúmulo de diversos carboidratos.

Os reguladores do crescimento de plantas estariam envolvidos com a regulação da força do dreno, particionamento de carboidratos e descarregamento do floema (ZHANG et al, 2001, 2004; PENG et al, 2003; ZHANG et al, 2005). Essa afirmação pode ser embasada com os nossos dados, pois em plântulas de cana-de-açúcar, a partir de 21 dias de tratamento (Figura 22) em todas as concentrações de GA₃ exógeno (0,5, 5 e 20 mg.L⁻¹) a relação entre fonte e dreno da parte aérea da plântula mudou, de forma que a razão entre sacarose e monossacarídeos (glucose e frutose) ficam próximas a um, o que significa dizer que nesse momento as plântulas utilizam para o seu desenvolvimento menos fotoassimilados do que produziram, permitindo o acúmulo de carboidratos, havendo nesse caso alteração no processo de fotomorfogênese da planta. O mesmo só ocorreu nas plântulas controle próximo aos 28 dias de tratamento, sugerindo assim que a GA₃ atuou acelerando esse processo, modificando então o particionamento de carboidratos nessas plântulas, causando mais uma vez variação do processo de fotomorfogênese. A fotomorgênese é um processo fisiológico que durante o ciclo de vida do vegetal, confere enormes vantagens no estabelecimento e na sobrevivência da planta, proporcionando diversas respostas, tais como germinação de sementes, inibição do alongamento caulinar, síntese de clorofila e antocianinas, expansão foliar, floração e tuberização, estão envolvidas diretamente com a duração e a qualidade da luz (KENDRICK & KRONENBERG, 1994)

Vimos também que a expressão de genes envolvidos com a biossíntese e transdução de sinal de vários hormônios foram alterados na presença tanto de GA₃ como do PBZ.

Respostas das plântulas tratadas com GA₃ e PBZ a alguns genes da via de transdução de sinal e biossíntese hormonal.

Em nossos estudos os genes 1 (relacionado com a biossíntese) e 3 (via de transdução de sinal) de AUX tiveram o número de transcritos aumentado em relação ao controle, nos tratamentos com GA₃ e PBZ. Sabemos que a auxina, é regulada pelas GAs e também desempenham um papel crucial em diversos aspectos de crescimento e desenvolvimento das plantas (SALMON et al, 2007), como o tropismo, a dominância apical, o desenvolvimento da raiz (WOODWARD & BARTEL, 2005). Esse hormônio também é responsivo a estímulos de carboidratos, principalmente glucose (MOORE et al, 2003), logo, vários estudos têm demonstrado, que sob estímulo de GAs, as auxinas respondem positivamente, consequentemente aumentando seu número de transcritos. No caso das plântulas tratadas com PBZ, podemos observar em nossos resultados (tabela 6A), que o gene relacionado com a biossíntese da AUX (1), aumentou em quase 2x sua expressão em relação ao tratamento com GA₃, e que no entanto o PBZ é um inibidor da biossíntese de todas as GAs, o que nos sugere que a planta de alguma forma busca uma via alternativa para suprir a carência de GA, e a auxina pode estar envolvida nesse processo, já que é um hormônio que possuiu algumas funções semelhantes às das GAs e isso poderia ajudar a planta a manter sua homeostase, muito embora REBERS et al (1994), tenha relatado que auxinas foram inibidas pela ação do PBZ.

Quando avaliamos a resposta de GA e ABA, sabemos que eles não só inibem mutuamente a biossíntese um do outro, mas também promovem o catabolismo um do outro (ZENTELLA et al, 2007). GA e ABA apresentam papeis antagônicos, com GA promovendo e ABA inibindo a germinação, crescimento da plântula e iniciação floral (GAZZARRINI & McCOURT, 2003; RAZEM et al, 2006; ZENTELLA et al, 2007). De acordo com o tratamento em que as plântulas foram submetidas ao GA₃, os dados mostraram exatamente essa resposta no gene que participa da via de biossíntese do ABA (8), ou seja, o número de transcritos foi diminuído, na presença de GA₃, no entanto no tratamento com PBZ onde não houve ação do GA, seria de se esperar a resposta contrária, já que GA não estaria presente, porém a planta tentando minimizar o efeito dessa ausência de GA pode desencadear outras respostas ainda desconhecidas, ou mesmo não permitir um efeito um efeito somatório entre ABA e PBZ, pois isso poderia inviabilizar a sobrevivência das plântulas. Dessa forma, os genes relacionados com a biossíntese de ABA também foram reprimidos.

Níveis de transcritos de GA 20-oxidase são regulados negativamente pela presença de GA (ou pelo sinal de GA) (PHILLIPS et al, 1995; XU ET al, 1995; TAIZ & ZEIGER, 2004). Nas plântulas tratadas com GA₃, ocorreu uma diminuição na expressão de genes GA20 oxidase (13 e 14), mostrando consistência com a literatura, já que foi fornecido GA exógeno para as plântulas e a resposta esperada seria a diminuição dos níveis dessa enzima, em virtude da existência do suprimento de GA para a planta, não havendo necessidade da formação de GAs bioativas. Já a deficiência de GA causada pelo tratamento com PBZ deveria ter induzido a resposta desses genes nas plântulas. No entanto, o mecanismo de controle das GAs é muito sensível e a sua ausência em função do efeito do PBZ pode levar a planta a não codificar a

referida proteína, já que esse mecanismo certamente percebe a necessidade da síntese em função da presença de GAs não-ativas, para então serem ativadas pela GA 20-oxidase.

Na cascata de sinalização das giberelinas, têm sido identificados receptores e vários componentes tanto positivos quanto negativos (SUN & GUBLER, 2004; HARTWECK & OLSZEWSKI, 2006), são eles agrupados em: proteínas DELLA, receptores de GA e proteinas F-box.

GAI – GA-insensitive (4), faz parte da subfamília das proteínas DELLA, que a) são consideradas repressoras da sinalização de GA porque atuam imediatamente reprimindo o receptor de GA para modular todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento induzido pelo GA em plantas (THOMAS & SUN, 2004; GRIFFITHS et al, 2006; NAKAJIMA et al, GA induz crescimento vegetativo, que são reprimidos pelo GAI (DILL & 2006), ou seja, SUN, 2001; KING et al, 2001). A maioria das proteínas DELLA, são rapidamente degradadas na presença de GA (ITOH et al, 2002; SUN & GUBLER, 2004; THOMAS & SUN, 2006), e embora acredite-se que GAI seja um regulador negativo do GA, FLECK & HARBERD (2002) sugerem que GAI não é degradado na presença de GA exógeno, e que ele por conseqüência não seria um regulador negativo de GA ao contrário de muitos estudos realizados (KING et al, 2001; RICHARDS et al, 2001; ITOH et al, 2002). Nossos dados também mostraram que GAI não se trata de um regulador negativo de GA, já que o gene não teve sua expressão reprimida na presença de GA₃, ao contrário, foi induzida. Acreditamos no caso das plântulas tratadas com GA3 que a indução do GAI (que pertence ao grupo de DELLA) pode ser uma tentativa da planta manter sua homeostase, pois se a expressão de DELLA não for aumentada para o controle do suprimento de GA3 exógeno, isso poderia causar um colapso total na planta, por que ela não teria nenhum mecanismo para tentar controlar o efeito da contínua presença do GA3 exógeno. Nas plântulas tratadas com PBZ a expressão do gene foi reprimida, o que poderia ser justificado pela pouca necessidade de sua atuação, já que a planta não esta sintetizando GA e apresenta exatamente o fenótipo contrário ao das plântulas tratadas com GA₃, função também desempenhada pelas proteínas DELLA. Proteínas que pertencem ao domínio GRAS (10) (GAI, RGA, SCARECROW- SCR), também pertencem a subfamília da proteína DELLA. Na presença de GA essas proteínas são rapidamente degradadas pelo complexo ubiquitina-proteosomo, justificando a repressão destas nas plântulas tratadas com GA₃. Já no tratamento com PBZ, como ocorre uma ausência total de GA e a planta já apresenta seu fenótipo contrário a presença de GA, a expressão desse gene também foi diminuída, pois se DELLA ainda atuasse nessas condições promovendo um efeito sinergístico com PBZ, a planta poderia entrar em colapso.

b) GID1 (9): é um receptor de GA solúvel. GID1 parece estar envolvido com a interação com as proteínas DELLA (GRIFFITHS et al, 2006; WILLIGE et al, 2007), mudando a conformação das proteínas DELLA, facilitando a ação das proteínas F-box (SLY1) (GRIFFITHS et al, 2006), resultando numa rápida degradação de DELLA, através da via ubiquitina-proteosomo. No tratamento realizado com GA₃, foi observado um aumento na expressão da proteína GAI, que faz parte de grupo de proteínas DELLA, e a diminuição no número de transcritos desse receptor (GID1), onde se sabe que DELLA atua na degradação dos receptores de GA, assim podemos sugerir que GAI atuou na diminuição no número de transcritos de GID1. Outra questão a ser considerada, é que GID1 tem uma alta afinidade por GA4 (UEGUCHI-TANAKA et al, 2007), e embora GA₄ endógeno esteja presente em cana-de-açúcar, seus níveis podem ser diminuíção devido a alta disponibilidade de GA₃ fornecido pelo tratamento exógeno, sendo assim a sinalização através do GID1 poderia ter sido prejudicada, justificando a diminuição na sua expressão gênica. Quanto ao tratamento com

PBZ, que é um composto que não tem receptor na cadeia de transdução de sinal de GA, nesse caso, é totalmente esperado que o receptor GID1 diminua a quantidade de transcritos.

A ubiquitina E3 ligase faz parte do complexo SCF, da qual faz parte a proteína c) F-box SLY1 (11) (McGINNIS et al, 2003; SASAKI et al, 2003), que são reguladores positivos da sinalização de GA. Parece que GA promove interação dos receptores GID1 com as proteínas DELLA (GRIFFITHS et al, 2006; NAKAJIMA et al, 2006; WILLIGE et al, 2007). Por sua vez isso pode causar mudança na conformação na proteina DELLA, que facilita a ação da proteína F-box (GRIFFITHS et al, 2006), resultando numa rápida degradação de DELLA através da via de ubiquitinação do proteossomo 26S (ZENTELLA et al, 2007). Acredita-se que SLY1 tem objetivo de degradar GAI induzido por GA, uma vez que elas são repressoras da sinalização de GA. Nossos dados mostraram a diminuição da expressão do gene SLY1 em ambos os tratamentos. Seria esperado que o gene fosse induzido no tratamento com GA₃, já que esse gene é um regulador positivo de GA, ou seja, na presença de GA ele também esta presente, no entanto, como a expressão do gene GAI (um tipo de proteína DELLA) foi aumentado, fica claro compreender a repressão de SLY, já que ele e DELLA possuem papeis contrários. O tratamento com PBZ não respondeu aumentando o seu número de transcritos em nenhum dos genes da via de transdução de sinal das GAs, sugerindo que o efeito do inibidor nessa via pode estar comprometido, em virtude da sua baixa especificidade com os receptores e interação com os demais componentes.

O ácido jasmônico (7) é um hormônio que afeta uma série de processos fisiológicos em plantas (Koda, 1992), o que inclui a indução de genes que codificam polipeptídeos específicos de folhas (Wiedhase et al, 1987), fenilalanina amônia-liase (PAL) (Gundlach et al, 1992) e também atuam na degradação da membrana celular durante a senescência (Siedow, 1991). GA₃ é conhecida por restringir a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (WOOD & PLEG, 1974), que pode levar a peroxidação dos lipídios, que é mediada pela enzima codificada por esse gene (PEARY & PRINCE, 1990). A diminuição da atividade dessa enzima e de seus transcritos na peroxidação lipídica está sendo relacionada com uma maior estabilidade da membrana, ocorrendo ainda o retardamento do processo de senescência (SINGH et al, 2008), o que em de cana-de-açúcar, de fato se refere ao efeito de GA₃. De acordo com PAPINI-TERZI et al, (2009), esse gene foi mais fortemente expresso em entrenós imaturos em cana, e em nosso caso, nas plântulas tratadas com PBZ, o que poderia ser justificado pela necessidade na manutenção dos processos de desenvolvimento do colmo, pois também ocorreu a indução do gene que codifica a enzima PAL (na tabela de parede celular 5D), que tem uma direta relação com LOX, e ambas estariam atuando nesses processos. Também pudemos verificar que GA₃ influencia a peroxidação lipídica, uma vez que a expressão do gene de LOX em plântulas tratadas com esse hormônio também foi reprimida, verificando a tabela referente aos genes da parede celular (tabela 6D), a expressão de PAL nas plântulas tratadas com GA₃ também foi reprimida (efeito da LOX).

Nossos dados mostraram que todos os genes avaliados, que estão relacionados com etileno (tabela 6A) foram reprimidos, o que é esperado, uma vez que as plântulas não foram envolvidas com nenhuma resposta direta aos efeitos do etileno. Já no tratamento realizado com PBZ, apenas gene (17), foi induzido. Não podemos desconsiderar esse resultado, pois um aumento na expressão do gene que codifica a ACC sintase, pode sem dúvida refletir na indução da síntese do etileno posteriormente. Vários dados mostram um retardamento no crescimento das plântulas tratadas com PBZ, mas seu efeito no desenvolvimento pode esta sendo inverso. O gene que codifica a LOX e agora da ACC sintase, foram induzidos em resposta ao processo de senescência.

5.2 Influência do GA₃, de PBZ 0,05mg.L⁻¹ na incorporação e partição de massa fresca em plântulas de cana-de-açúcar em relação ao tempo de tratamento.

Nossos dados (tabela 3) mostram uma forte relação entre concentração de GA_3 e aumento na massa fresca, que pode ser devido a interferência do hormônio no acúmulo de água, já que é conhecido que uma das principais influências do GA₃ na germinação se dá através do favorecimento na absorção de água. Na fase estudada esse fator pode ser explicado principalmente pelo acúmulo de carboidratos, que desencadeia respostas semelhantes. Assim, então podemos dizer que quanto maior foi o acúmulo de carboidratos, maior foi o ganho de massa fresca nas plântulas. Com relação a partição entre raiz e parte aérea, sabemos que um conhecido efeito das GAs é a sua ação no alongamento celular. Também foi constatado que GA₃ exógeno atua de forma efetiva na expansão celular (OZGA & DENNIS, 2003; ZHANG et al, 2005), por estarem diretamente relacionadas com enzimas da parede celular, como a XTH e expansinas. De acordo com HAYASHI & TANABE (1991), GA também interfere na composição da parede celular, embora tenhamos visto em nossos dados (figura 27 e anexo 7) que não houve grandes variações em sua constituição, pois, como já foi dito antes, a função da parede celular em cultura *in vitro* se torna praticamente restrita a proteção contra perda de água.

Respostas das plântulas tratadas com GA₃ e PBZ a alguns genes envolvidos com a parede celular.

Vimos que o gene da biossíntese do ácido jasmônico, LOX, (7), pode atuar na indução de transcritos de PAL (33), e que o tratamento realizado com PBZ induziu o gene de LOX, consequentemente, induzindo PAL. Na presença de GA₃, tivemos uma diminuição no número de esses transcritos. O fato das plântulas tratadas com PBZ induzirem PAL, pode ser devido a

expansão radial das células, o que também demandaria alterações na biossíntese da parede celular. Já no tratamento com GA₃, embora estejam ocorrendo modificações na parede celular, esse gene não foi responsivo, muito provavelmente numa tentativa da planta minimizar os efeitos da extensão celular desencadeada pela GA₃, que ocorre em função dos genes da XET e expansinas.

A atividade da XET/XTH (34 e 35) é associada a múltiplos processos relacionados ao crescimento, rápida expansão celular (UOZU et al, 2000; BUSATO et al, 2001; ISHIMARU & KOBAYASHI, 2002). Relatos em diferentes espécies vegetais têm mostrado que a enzima participa do processo de transglicosilação do xiloglucano em diferentes fases do desenvolvimento (TALBOTT & RAY, 1992). As XET têm sido diferencialmente reguladas em vários estágios de desenvolvimento e por diversos estímulos ambientais (XU et al, 1996; SCHÜNMANN et al, 1997; UOZU et al, 2000). Na presença de AUX e GA, elas têm aumentado sua expressão (SCHÜNMANN et al, 1997; JAN et al, 2004, CUI et al, 2005). O tratamento com GA induz o alongamento do caule e das folhas em diversas espécies de plantas, aumentando a atividade da XET (SCHÜNMANN et al, 1997; BURSTIN, 2000; UOZU et al, 2000), e a presença de GA₃ exógeno tem demonstrado o mesmo efeito (YOKOYAMA & NISHITANI, 2001; CUI et al, 2005; HUERTA et al, 2008). O mesmo efeito foi visto em nossos dados, pois o tratamento com GA₃ exógeno em plântulas de canade-açúcar aumentou o número de transcritos para XET, em nossos dados também foi visto o aumento de transcritos relacionados com AUX, o que também favorece o aumento na expressão de XET. Já em relação ao tratamento com PBZ, podemos sugerir algumas possibilidades para o aumento da expressão dos genes relacionados a XET: i) as plântulas tratadas com PBZ também tiveram o número de transcritos relacionados com AUX aumentados, e como a XET também é responsiva a AUX, isso justificaria o aumento também na expressão da XET; ii) as plântulas tratadas com PBZ apresentam um expansão radial, o que seria a principal justificativa na alteração positiva na expressão dos genes relacionados com a XET, já que a enzima atua na expansão celular.

Estudos indicam que os vários membros da família da celulose sintase (36 e 38) em diferentes espécies são diferencialmente expressos em vários tipos de tecidos e na formação da parede primária e/ou secundária da célula (RICHMOND, 2000; RICHMOND & SOMERVILLE, 2000). Por exemplo, a proteína CesA1 (RSW1) é responsável pela biossíntese da parede celular primária em toda a planta, enquanto a proteína CesA7 (IRX3) participa apenas na biossíntese da parede celular secundária no caule. O gene cuja expressão se encontrou induzida tanto no tratamento com GA₃ e no PBZ foi o IRX3 (Irregulgar Xylem 3) que quando silenciado gera alterações no xilema em Arabidopsis. Portanto, é possível que esteja relacionado diretamente com a síntese e deposição de celulose nos vasos do xilema durante o desenvolvimento. Podemos observar na (figura 27 e anexo 7), que nas plântulas tratadas com PBZ mostram maiores teores de xilose na sua constituição e que justificaria a ação do referido aumento no número de transcritos desse gene.

As expansinas (37, 39 e 40) têm a habilidade de promover a extensão da parede celular em um curto espaço de tempo (McQUEEN-MASON et al, 1992; COSGROVE, 1999). Elas permitem o deslizamento das microfibrilas através de um mecanismo não usual, não hidrolítico, que interrompe a adesão não covalente dos polissacarídeos da matriz (McQUEEN-MASON & COSGROVE, 1994). Essas proteínas são consideradas reguladoras primárias no crescimento celular da planta (DARLEY et al, 2001). Vários autores relataram a expressão e atividade de expansinas em tecidos em crescimento (ZENONI et al, 2004). Foi observado em milho, que a α -expansina 1 e β -expansina 8 tiveram sua expressão aumentada em órgãos jovens e plantas imaturas, no entanto, em plantas de milho as α são mais expressas no sistema

radicular (WU et al, 2001a). Vários hormônios são relatados por modificar o nível de transcritos de genes de expansinas em outros sistemas, por exemplo: auxinas aumentam níveis de expansinas em hipocótilos de tomate (CADERAS et al, 2000; CATALA et al, 2000), giberelinas estimulam a expressão transcritos de expansinas em entrenós de arroz (CHO & KENDE, 1997), e etileno causa o acúmulo de transcritos de expansinas em folhas de Rumex palustris e Rumex acetosa (VRIEZEN et al, 2000) e ainda no amadurecimento de frutos de tomate (ROSE et al, 1997). Nossos dados mostram um discreto aumento no número de transcritos na beta-expansina (37) no tratamento com GA₃, e uma drástica redução na expressão dos genes das duas alfa-expansinas (39 e 40). No tratamento com PBZ todas as expansinas foram reprimidas. Podemos sugerir que a beta-expansina no tratamento com GA₃ atua na expansão longitudinal das células, já, que o referido tratamento aumenta o tamanho da célula longitudinalmente, e ainda em relação as alfa-expansinas, podemos justificar sua menor expressão por ela ser mais facilmente encontrada na região do sistema radicular, conforme proposto por (WU et al, 2001) e ela não atuaria necessariamente na região caulinar dessas plântulas nas condições estudadas. E finalmente as plântulas tratadas com PBZ embora tenham sofrido uma expansão radial, a beta-expansina parecem não estar envolvidas nesse processo, por essa razão, nessas plântulas sua expressão foi diminuída.

O produto da ação do gene da UDGH (41) (UDP-glucoronato) é convertido em xilose e arabinose que são precursores para formação da hemicelulose e pectina (LOEWUS & DICKINSON, 1982; FEINGOLD & BARBER, 1990). Tanto a xilose como a arabinose são componentes chaves na constituição da parede celular, fortalecendo a matriz da parede celular (WITT, 1992; GIBEAUT & CARPITA, 1994; GIBEAUT, 2000). Mais de 60% do conteúdo total de polissacarídeos para parede celular é derivado direta ou indiretamente da UDPglucoronato (SEITZ et al, 2000). Nossos dados mostraram que em ambos os tratamentos, o número de transcritos para UGDH foi diminuído, sugerindo não haver alterações significativas na constituição das hemiceluloses e pectinas da região estudada (parte aérea), dados que também foram apresentados nos resultados da figura 27 (ver anexo 7). Foi visto que em *Populus* o gene foi expresso predominantemente na diferenciação do xilema e folhas jovens, com pouca expressão na zona do floema do caule. Nas folhas, a expressão foi diminuída por suprimento de curto prazo com sacarose, e este efeito foi, de certa forma semelhante por exposição à luz (JOHANSSON et al, 2002).

Foi mostrado que o GA tem seus teores aumentados na fase de crescimento do caule, e que em alguns casos os carboidratos não são acumulados nessa fase, pois os fotoassimilados são direcionados para o crescimento (LEITE et al, 2003). Muitas plantas também respondem ao retardamento da senescência nessa fase, pois a planta utiliza seus recursos energéticos primeiramente para promover o crescimento em detrimento das estruturas florais (MAHOUACHI et al, 2009). Todos os fatores de transcrição estudados em nosso trabalho relacionados com o processo de floração e senescência, tiveram sua expressão gênica reprimidos no tratamento com GA₃. Para a condição de crescimento celular, é necessário uma grande disponibilidade de energia, e a enzima, invertase ácida, atua hidrolisando a sacarose presente, em hexoses para suprir a demanda de energia (KAUR et al, 2000), então geralmente nessa situação ocorre a indução da invertase, e redução nos teores de sacarose (RANWALA & MILLER, 2008), fatos que não foram constatados em nossos dados, provavelmente por que o GA₃ interfere no acúmulo de sacarose, favorecendo seu armazenamento (figura 21). Mesmo em condições de crescimento, neste trabalho as plântulas tratadas com GA3 continuam As giberelinas estão envolvidas com as auxinas que também acumulando sacarose. desempenham um papel importante na expressão de maior atividade da invertase ácida durante a rápida fase de alongamento, permitindo que a clivagem de sacarose para hexoses sejam utilizadas no alongamento das células (RANWALA & MILLER, 2008), e alguns genes relacionados com auxinas foram induzidos no tratamento com GA₃ (tabela 6A), o que demonstra uma interferência de GA₃ no metabolismo de auxina.

Outro efeito concomitante ao processo de alongamento celular é a divisão celular, que envolve variações no metabolismo dos ácidos nucléicos, e para comprovar tal efeito, foram avaliados alguns genes com essa relação. Nesse caso, podemos comprovar o acúmulo de sacarose meio a um processo de intensa expansão celular e também com divisões mitóticas (que também podem ser visualizadas na figura 24).

Respostas das plântulas tratadas com GA₃ e PBZ a alguns genes do ciclo celular.

O GA presente na camada de aleurona induz a expressão desse gene nuclease I (28) (BROWN & HO, 1986). Em plântulas de cana, ambos os tratamentos (PBZ e GA₃) induziram a expressão deste gene, indicando a existência de alterações no metabolismo de ácidos nucléicos, o que pode ser justificado pela intensa atividade meristemática existente, já que as plântulas são jovens e estão envolvidas com mecanismos de divisão celular, resultando no aumento da demanda de nutrientes para as células, onde a principal função desse gene seria a transferência de produtos da degradação dos ácidos nucléicos para locais de demanda de nutrientes após a morte celular (BLEECKER, 1998).

O regulador de transcrição dependente de DNA (29), é um dos genes que foi induzido por GA₃ e reprimido por PBZ. Ele poderia estar, portanto relacionado ao processamento de RNA relacionado à sinalização por GA₃, favorecendo processos de divisão celular, por exemplo.

Foi visto em alguns organismos que as histonas (32) desempenham um papel crucial na replicação e transcrição do DNA. A maturação dos entrenós em cana-de-acúcar acarretou

na redução de expressão de histonas associadas com a replicação de DNA, o que provavelmente reflete uma redução na divisão celular nesse tecido (CASU et al, 2004), em plantas jovens de cana-de-açúcar na presença de sacarose e glucose esse gene também foi reprimido (BRANCO, 2008). De acordo com nossos dados o gene cuja função foi descrita acima, foi reprimido frente ao uso d PBZ e de GA₃. Como esses genes estão relacionados, em geral ao processamento do DNA durante o desenvolvimento, mas também são responsivos a sacarose e glucose, muito provavelmente a reposta em relação ao tratamento com GA₃ foi em função da sinalização por açúcar, já nas plântulas tratadas com PBZ, podemos entender que houve uma diminuição no número de transcritos em função do processo de menor divisão celular.

Diante dos favoráveis efeitos do GA3 na região caulinar em relação ao alongamento celular, tendo em vista todos os argumentos apresentados até o momento, a planta tem o seu processo natural de fotomorgênese alterado e investe de forma agressiva no crescimento da parte aérea, e o sistema radicular pouco se desenvolve em detrimento do epicótilo. É importante lembramos que tanto o processo de alongamento quanto o de divisão celular são acompanhados de uma grande demanda energética, que é suprida através da fotossíntese e também na fixação de carbono para síntese de carboidratos. Nos dados mostraram que diversos genes foram induzidos nas condições estudadas.

Respostas das plântulas tratadas com GA₃ e PBZ a alguns genes envolvidos com a fotossíntese.

A primeira reação enzimática da fotossíntese das plantas C₄ é a reação reversível hidratada catalisada pela anidrase carbônica (49), que converte CO₂ em bicarbonato (HCO3-), que posteriormente é fixado pela PEPC (KANAI & EDWARDS, 1999). As plântulas tratadas com GA₃ tiveram a expressão desse gene diminuída, mas de acordo com COUSINS et al (2006) foi visto que reduzidos níveis de expressão da anidrase carbônica (aproximadamente 20%) não afetou a assimilação de CO_2 , embora grandes mudanças na atividade da CA tenha tido um pequeno efeito nas taxas de fotossíntese (FARQUHAR, 1983). De acordo com os dados de COUSINS et al (2006) a atividade da CA parece ser maior do que a necessária para manter a rede de assimilação de CO₂ e a diminuição na sua atividade não afetou a taxa de assimilação de CO_2 , exceto quando as taxas foram drasticamente reduzidas. As plântulas tratadas com PBZ obtiveram aumento na expressão do gene, o que podemos sugerir, que as plântulas que foram tratadas com PBZ têm maiores limitações em relação ao tamanho das folhas, quantidade de maquinaria fotossintética limitada em relação as plântulas tratadas com GA₃, em virtude da diminuição celular, justificando uma necessidade maior de aumentar expressão desse gene para suprir a demanda fotossintética das células.

O efeito do GA na fotossíntese ainda é muito controverso, alguns autores relatam que a aplicação de GA₃ foi positiva nas culturas estudas (HAYAT et al, 2001; YUAM & XU, 2001), foi negativa (DIJKSTRA; REEGEN & KUIPER, 1990) ou indiferente (CRAMER et al, 1995). Aparentemente esses resultados contraditórios podem ter sido causados devido a grandes diferenças nos sistemas experimentais e métodos para determinar a fotossíntese (NAGEL & LAMBERS, 2002). Segundo dados de HUERTA et al (2008), plantas com GA endógeno

aumentado, induziram a expressão de genes relacionados com a fotossíntese (clorofila a/b) (42, 43 e 47), no entanto com aplicação de GA₃ exógeno, o efeito observado foi contrário, ou seja, houve a diminuição de expressão gênica de todos os genes relacionados com a fotossíntese, isso muito provavelmente devido ao pouco período de exposição dessas plantas ao GA₃, que foi de apenas 24 horas. No caso dos nossos experimentos, tanto GA₃ quanto PBZ, induziram a expressão de dois dos genes relacionados ao complexo LHC (42 e 43) em plântulas de cana, o que sugere que o programa de fotomorfogênese foi ativado. Podemos especular que o fato desses genes terem tido sua expressão aumentada nas plântulas tratadas com GA₃, se deve a necessidade do aumento no suprimento de elétrons necessários para atender a demanda dos carboidratos que foram acumulados na sua parte aérea, e ainda precisamos ressaltar que há uma necessidade real do aumento na expressão desses genes, para atender a demanda de crescimento que esta ocorrendo na célula. Já com relação as plântulas tratadas com PBZ, podemos fazer uma relação com seus teores de clorofila, que em diversas culturas foram aumentadas. Nessas plântulas foi possível observar uma pigmentação verde bem mais intensa do que as plântulas tratadas com GA₃. Essas plântulas podem responder ao tratamento com PBZ aumentando sua capacidade fotossintética na tentativa de disponibilizar elementos para sua melhor performance no desenvolvimento que é limitado devido ao efeito do composto.

Particularmente em plantas com metabolismo C₄ e CAM, a PEPC (44) é fortemente expressa, pois ela catalisa a fixação inicial do CO₂ durante a fotossíntese. As PEPC de plantas C₄ são ativadas também pela glucose (TOVAR-MENDEZ et al, 2000) e pela luz. No entanto, as PEPC das plantas superiores são reguladas pós-transcrionalmente por fosforilação. A reação de fosforilação da PEPC é catalizada pela Ser/Thr quinase, ou seja, a regulação redox da reação é controlada pelas quinases (SAZE et al, 2001). De acordo com dados de GURALNICK et al (2001) após 5 semanas com tratamento com GA₃ em uma *Crassulacea*, houve aumento na atividade da PEP, e esses teores se aproximaram a tratamentos realizados com estresse salino. O aumento na expressão de PEPC na parte aérea de plântulas de canade-açúcar com a adição de GA₃ e PBZ é consistente com a indução de um programa de fotomorfogênese, em que o sistema fotossintético passa a ser montado e se torna independente, sem contar que esta sendo associada um controle da PEPC pelas proteínas quinases Ser/Thr que também foram induzidas em ambos os tratamentos, lembramos ainda que cana-de-açúcar possui metabolismo C4, que naturalmente já justificaria a indução de genes relacionados com PEPC.

O gene PPDK (45) de plantas C_4 é exclusivamente expresso em tecidos fotossintéticos. De acordo com os nossos dados, o número de transcritos aumentou tanto em plântulas tratadas com GA₃, quanto nas tratadas com PBZ. A expressão do gene também é regulada pela luz: é baixa nas folhas estiolados e é aumentada por iluminação, controle que também é observado em plantas C₃ (MATSUOKA, 1995). Plantas C₃ expressando a piruvato carboxilase (PEPC) e piruvato, dikinase ortofosfato (PPDK) apresentam uma maior capacidade fotossintética (até 35%) (KU et al, 2001). O aumento da capacidade fotossintética nessas plantas está associado principalmente com um reforço de condutância estomática e uma maior concentração de CO2 interno (KU et al, 2001). PEPC e PPDK estão envolvidas em plantas de arroz com uma maior tolerância ao estresse, capacidade fotossintética e produtividade (KU et al, 2001). A descoberta de que o gene da PPDK é induzido em ambos os tratamentos (GA₃ e PBZ) em plântulas de cana-de-açúcar, é consistente com o que foi observado para os demais genes relacionados à fotossíntese, indicando que há indução do programa de fotomorfogênese além de integrar as respostas aos demais genes de fotossíntese vistos até aqui.
A TIM (46) é uma enzima glicolítica que catalisa um importante precursor (diidroxicetona e gliceraldeído 3P), que tem um papel importante em várias vias metabólicas e é essencial para uma eficiente produção de energia (NAGANO et al, 2002). Nossos dados mostraram a indução desse gene nos dois tratamentos realizados, mostrando consistência com todos os outros genes que também foram induzidos, com isso a enzima pode atender a disponibilidade de substrato em função do aumento desses compostos que foram fornecidos pela maior atividade fotossintética observada nas plântulas.

A aconitase hidratase (48) possui funções tanto no TCA (ciclo do ácido tricarbolíxico) quanto no ciclo do glioxilato. O ciclo TCA também fornece precursores para a produção de aminoácidos. Essa enzima tem uma segunda função não catalítica essencial na manutenção do DNA mitocondrial. A aconitase regula a sintese de outras proteínas como a superóxido dismutase (que também foi induzida no tratamento com PBZ) e outras enzimas envolvidas com estresse oxidativo. Em plântulas tratadas com GA₃, a expressão gênica da aconitase foi diminuída, enquanto que plântulas tratadas com PBZ foi aumentada, sugerindo em as plântulas tratadas com PBZ podem estar envolvidas com respostas relacionadas ao estresse oxidativo, diferente das plântulas tratadas com GA₃.

Em função principalmente do acúmulo de carboidratos, vários genes responsivos a glucose e sacarose tiveram sua expressão alterada em função dos tratamentos realizados, favorecendo um ajuste fisiológico para que as plântulas alcançassem uma homeostasia, e apresentassem a melhor resposta possível para o seu desenvolvimento.

Respostas das plântulas tratadas com GA₃ e PBZ a alguns genes envolvidos com diversas funções que possivelmente afetam metabolismo de carboidratos.

As hsp 74 estão relacionadas com uma variedade de funcões vinculadas aos processos protéicos, como, importação de proteínas para o RE e mitocôndrias, enovelamento de proteínas e remodelação ou dissociação de complexos protéicos (YOUNG et al, 2003; MAYER & BUKAU, 2005; SOUSA & LAFER, 2006). Algumas delas são apenas expressas em condições de estresse térmico (estritamente induzível), enquanto outras estão presentes nas De acordo com nossos células em condições normais de crescimento (constitutiva). resultados, houve aumento no número de transcritos que codifica a proteína tanto nas plântulas tratadas com GA₃ quanto com PBZ, podemos sugerir que a referida proteína estaria envolvida com o empacotamento de proteínas provenientes do Retículo endoplasmático e do Complexo de Golgi. As plântulas estão em desenvolvimento o que justificaria um aumento na demanda do gene, e foram vistos vários genes com a expressão aumentada relacionados com o desenvolvimento das plântulas, como parede celular, por exemplo. De acordo com PAPPINI-TERZI (2005) e BRANCO (2008) esses genes se mostram responsivos ao acúmulo de sacarose. Em nosso material também foi acumulado sacarose, o que permite suprir a demanda da atividade da referida proteína.

A MIP (75) e a TIP (76) estão envolvidas com importantes funções fisiológicas, incluindo a permeabilidade da água, e provavelmente para a adaptação de uma variedade de estresses hídricos em relação a compartimentação celular (MAUREL et al, 1997; WEIG et al, 1997). Em nossos resultados o gene que codifica a expressão da MIP (75) foi induzida no tratamento das plântulas com GA₃, sugerindo que nessas condições (onde foram vistos maiores concentrações de açúcares) há uma mudança no potencial osmótico dessas células necessitando da interferência das aquaporinas presentes na membrana plasmática permitindo

um ajuste no equilíbrio osmóticos dessas células. Já o gene TIP (76), foi induzido nos dois tratamentos, sugerindo o mesmo efeito, no entanto a nível intracelular, pois a TIP está relacionada com o vacúolo, ressaltando aqui, que mesmo as plântulas tratadas com PBZ tendo menores teores de carboidratos em suas células, o efeito do mesmo sobre o tamanho celular, alterou o potencial osmótico das células.

As deidrinas (DHNs) (77): estão envolvidas com a proteção das proteínas. Elas funcionam como estabilizadores de membrana (KOAG et al, 2003). Sabemos também do envolvimento de ABA em respostas a estresse hídrico. O ABA está relacionado com a indução de algumas deidrinas, uma vez que elas são responsivas ao estresse osmótico (NAMBARA et al, 2005) e a sinalização por açúcar (GUPTA et al, 2005; BRANCO, 2008). De acordo com nossos dados a utilização de GA₃ influência o acúmulo nos teores de açúcares no interior das células, e a pequena capacidade das plântulas tratadas com PBZ de armazenar água também altera o potencial osmótico das células, sugerindo que a indução desse gene seja relacionado ao estresse osmótico desencadeado por ambos os tratamentos.

Proteínas Tipo 2A serina/treonina fosfatases (PP2A) (78) estão envolvidas com processos hormonais, de defesa a patógenos ou respostas ao estresse ambiental (GARBERS et al, 1996; SCHONTAL, 1998; JANSSENS & GORIS, 2001). Em *Arabidopsis* PPA2 tem aumentado o seu número de transcritos em função a resposta ao choque térmico. Em ambos os tratamentos, a expressão do gene PP2A foi induzida, e como esse gene pode ter uma relação com outros genes que são responsivos a estresse térmico, que em nossos experimentos, também foram induzidos em ambos os tratamentos, como o Heat Shock (74), podemos sugerir que há uma relação na resposta desses genes nos tratamentos realizados.

Citocromo P450 (óxido sintase) (79) são importantes na biossíntese de algumas substâncias do metabolismo secundário como flavonóides, alcalóides e hormônios

132

(MANGOLD et al, 1994; KALTENBACH et al, 1999; IRMLER et al, 2000) e ainda podem participar na desintoxição de xenobióticos em plantas, principalmente herbicidas. Nas plântulas tratadas com GA₃ esse gene teve sua expressão reduzida, enquanto que nas plântulas tratadas com PBZ ela foi induzida, sugerindo que o PBZ pode induzir uma resposta nas plântulas, permitindo sua parcial eliminação, e também na tentativa de suprir a ausência de GA (já que ele bloqueia sua síntese), aumentando a expressão do gene na tentativa de aumentar a síntese de compostos secundários que poderiam minimizar esses efeitos.

Tioredoxinas (TRX) (81) desempenham um papel central como importantes elementos reguladores do metabolismo das plantas. As TRH de várias plantas são diferentes em estrutura e função. Podem estar envolvidas com a fotossíntese, associadas ao transporte no floema (ISHIWATARI et al, 1995), elas ajudam a mediar o transporte através do plasmodemata, formando pontes intercelulares citoplasmáticas (ISHIWATARI et al, 1998), De acordo com PETERSON et al (2005) em *Arabidopsis* a única função das TRX também foi a translocação plasmodemal. A TRX foi reprimida em ambos os tratamentos, o que ser devido a outras condições de transporte nas células, no caso da plântulas tratadas com GA3, essa função pode ser substituída pelo próprio GA3 e no caso das plântulas tratadas com PBZ, houve a indução de gene relacionado com o transporte (gene 87), o que pode ter suprimido a ação da TRX.

Calreticulas (CRT) (82) estão envolvidas em uma variedade de processos celulares (BAUMANN & WALZ, 2001; ARNAUDEAU et al, 2002; MICHALAK, 2005). Já foi descrita a participação de íons Ca⁺² na sinalização por açúcar em plantas (PITON & NAKAMURA, 1995; IWATA et al, 1998). Os dois sistemas de membrana (tonoplasto e retículo endoplasmático) são potencialmente os locais mais importantes para o controle na concentração de Ca²⁺ intracelular nas plantas. Armazenamento de Ca²⁺ dentro das

membranas intracelulares é de grande importância porque permite uma rápida e maciça mobilização de Ca²⁺ durante um evento de sinalização, e fornece o tamponamento necessário para evitar uma sobrecarga de Ca²⁺. As plântulas tratadas com GA₃ e PBZ tiveram a expressão desse gene diminuída. As CRTs em plantas são induzidas em resposta a uma variedade de estímulos mediados por estresse como, por exemplo, moléculas sinalizadoras relacionadas a patógenos (DENECKE et al, 1995; JAUBERT et al, 2002), estímulo por gravidade (HEILMANN et al, 2001) e ainda mostram-se muito expressas durante a mitose (DENECKE et al, 1995), embriogênese (BORISJUK et al, 1998) e em tecidos florais (CHEN et al, 1994; DENECKE et al, 1995; NELSON et al, 1997). De todos os aspectos mencionados, a mitose seria o único que poderia desencadear a indução do gene, no entanto, mesmo as plântulas passando por intenso processo mitótico a CRT2 não foi induzida, seria necessário a verificação de outros genes com a mesma função, possivelmente envolvidos nesse processo.

Glicosil UDP transferases (UGT) (83), a glicosilação é um mecanismos capaz de reconhecer pequenas moléculas lipofílicas incluindo hormônios, metabólitos secundários e tanto toxinas abióticas como bióticas (LIM & BOWLES, 2004; BOWLES et al, 2005). Uma das mais importantes e representativas reações de glicosilação em plantas é a formação das antocianinas. Em plantas esses compostos são determinantes na coloração de flores e frutos. A glicosilação é o principal mecanismo influenciado pela atividade de hormônios, metabólitos secundários e mecanismos influenciados pelo meio ambiente, como toxinas, por exemplo (OFFEN et al, 2006). Em plântulas de cana-de-açúcar tratadas tanto com PBZ quanto com GA₃, o genes envolvido com a transcrição da enzima teve sua expressão reduzida. É possível, portanto, que haja redução na conjugação de hormônios, PBZ e de antocianinas. Em plantas de tomate quando se adicionou GA os teores de antocianina também foram reduzidos (WHITE et al, 2000; CARVALHO, 2007).

Proteína tirosina fosfatase (pTyr) (85); Proteínas Tipo 2C serina/treonina fosfatases (PP2C) (86). As proteínas (85) são proteínas fosfatases de dupla especificidade (DSPs), regulam a transdução de sinal mitogênica e controlam o ciclo celular (PILS & SCHULTZ, 2004). Enzimas PP2C (86) diferem de outras fosfatases serina / treonina pois elas requerem Mn²⁺ e / ou Mg²⁺⁺ e são insensíveis ao inibidor da fosfatase ácida ocadaico (COHEN, 1989). Em levedura, mamíferos e plantas, a regulação das cascatas de MAPK tem sido atribuída em função a PP2C. Múltiplas vias MAPK são diferencialmente ativados por uma variedade de estímulos externos, incluindo fatores de crescimento bióticos e abióticos. O módulo de sinalização da MAPK é composto de três proteínas quinases. MAPKs são ativadas exclusivamente pela fosforilação dos resíduos de treonina e tirosina altamente conservadas, que é realizado por um determinado MAPK quinase (MAPKK). Mais adiante, MAPKK é ativado por uma quinase específica MAPKK (MAPKKK) através da fosforilação da treonina conservada e / ou resíduos de serina, porém não existe até o momento qualquer prova de relevância biológica que a PP2C regule as MAPKs ao nível da planta inteira. Já a inativação, de vias MAPK pode ser mediada por desfosforilação por uma série de fosfatases fosfoproteína, incluindo fosfatases de dupla especificidade (85), fosfatases tirosina ou fosfatases serina/treonina. Várias PP2Cs são envolvidos em respostas ao ABA, ferimento induz a produção de ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), que são mensageiros para ativar respostas de defesa (PETERSON et al, 2000; MESKIENE et al, 2003; SCHWEIGHOFER et al, 2007). Tanto nas plântulas tratadas com GA₃ e com PBZ ocorreu repressão do gene PP2C, e indução da MAPK, o que seria esperado, já que para MAPK estar reprimida deveria ocorrer um aumento no número de transcritos de PP2C. Além disso, em ambos os casos, o ABA e os genes analisados da via do etileno foram reprimidos, dessa forma as plântulas não foram expostas às condições necessárias para a indução do gene. É importante observar que PP2C é capaz de desfosforilar e ativar a enzima SPS, diminuindo a concentração de Pi (revisado por WINTER & HUBER, 2000), no entanto isso não foi observado nos genes estudados, ou seja PP2C foi reprimido assim como SPS, tanto em plântulas tratadas com PBZ quanto nas tratadas com GA₃.

(MFS)(87) são transportadores secundário de polipeptídeos, capazes de transportar pequenos solutos em resposta a gradientes quimiosmóticos de íons. A familia SP, uma das mais importantes tem como substratos transportados hexoses, pentoses, monossacarídeos, dissacarídeos, inositóis quinato, e cátions orgânicos. A maioria dos membros da família SP pode catalisar o transporte de carboidratos. A expressão desse gene foi diminuída em plântulas tratadas com GA_3 e aumentada nas tratadas com PBZ, sinalizando que o GA pode estar envolvido com o transporte de acúcares conforme mencionado na discussão da parte I da tese, pelo fato do PBZ não desempenhar a mesma função, houve então a indução do gene que ajudaria a desempenhar essa função. A indução na expressão de alguns tipos de transportadores de açúcar nas plantas tratadas pode também estar correlacionada ao aumento da capacidade de transporte dos fotoassimilados, o que foi visto no tratamento com PBZ nos genes envolvidos com a fotossíntese. Os transportadores de açúcares podem se ajustar à função de fornecedores de açúcares para o crescimento e desenvolvimento da planta ou estar envolvidos em formação de gradiente osmótico para determinar o fluxo de açúcares, já que o PBZ não desempenha essa função. Alguns transportadores também podem estar envolvidos com sinalização, podendo ser regulados em diferentes níveis durante o desenvolvimento da planta ou quando há uma perturbação ambiental (WILLIAMS et al, 2000).

A partir dos efeitos desencadeados pelos tratamentos na expansão celular, nas divisões mitóticas, nos genes envolvidos com a fotossíntese, temos uma conseqüente alteração

na resposta de vários genes envolvidos com a fixação de carbono e de proteínas quinases para atender a demanda energética das células.

Respostas das plântulas tratadas com GA₃ e PBZ a alguns genes envolvidos com o metabolismo de carboidratos:

O aumento no número de transcritos da enzima frutose bifosfato aldolase (52), assim como da sua atividade parecem estar relacionados com o acúmulo de carboidratos solúveis e a síntese de ATP através da promoção da via glicolítica (BARRY et al, 1998; GROSS et al, 1999; KONISHI et al, 2004). Diversos autores têm relacionado o aumento na expressão gênica dessa enzima devido a uma resposta a alta salinidade (YAMADA et al, 2000; ZHANG et al, 2003). De acordo com nossos dados, os dois tratamentos induziram a expressão do gene que codifica a enzima, sugerindo um aumento na via glicolítica, que pode ser em reposta do aumento na disponibilidade de energia proveniente da fotossíntese, uma vez que vários genes, também aumentaram o número de transcritos.

Beta-glucosidase (53, 54 e 66): Nas plantas existem uma enorme variedade de enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas (CZJZEK et al, 2001; VERDOUCQ et al, 2004), e essa hidrólise é fundamental para a absorção de energia, degradação da parede celular (SICKER et al, 2000; ZAGROBELNY et al, 2004). No caso do gene (53), tivemos um aumento da expressão tanto em plântulas tratadas com GA₃ quanto nas tratadas com PBZ, sugerindo uma resposta em virtude de mudanças causadas no metabolismo das plântulas para atender, por exemplo, a demanda de energia proveniente da fotossíntese, no entanto, o aumento de expressão do gene que codifica esse precursor não desecandeou uma resposta no gene (54 e 66) que codificam a enzima propriamente dita, no tratamento com PBZ. Enquanto que nas plântulas tratadas com GA₃, tanto o precursor quanto a beta-glucosidase

tiveram o seu número de transcritos aumentado, sinalizando dessa forma que pode haver uma interação entre GA, precursor e enzima.

As Proteínas quinases (PKs) (55, 56, 57, 58, 59, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73) são fundamentais nos processos de fosforilazação ocorridos nas células, por essa razão elas desempenham um papel em uma grande variedade de processos celulares, incluindo divisão, proliferação, apoptose e diferenciação (FRANCIS & HALFORD, 2006; FRANCIS & HALFORD, 2006; POLGE & THOMAS, 2007).

Devido a enorme gama de proteínas quinases, elas receberam diversas classificações. De acordo com FELIX et al (2007), em plantas adultas de cana-de-açúcar, existe uma relação entre o número de transcritos e consequentemente da atividade de proteínas quinases (SnRK1) e o acúmulo de sacarose no colmo, pois proteínas quinases em associação com proteínas 14-3-3 fosforilam e posteriormente inibem a atividade de enzimas como a sacarose fosfato sintase (SPS) (SUGDEN et al, 1999; TOROSER et al, 1998), o que permite o acúmulo de carboidratos. As Osmotic Stress-Activated Kinases - PK e CBL-interacting Protein Kinases -CIPK, também foram alteradas de acordo com FELIX et al (2007) na maturação do colmo. As CIPK se ligam a cálcio, que é sinalizador do processo (SANDERS et al, 2002). Tanto as PKs quanto as CIPKs mediam a resposta à seca, estresse osmótico, salino e frio em resposta a sinais de ABA e cálcio (BOUDSOCQ & LAURIERE, 2005). De acordo com nossos dados, as plântulas tratadas com GA3 e PBZ induziram quinases desses grupos. É possível que o estresse osmótico gerado pela alta concentração de sacarose na célula sinalize, via CIPKs e PKs, para alterações de expressão gênica em resposta a este estresse, embora as plântulas tratadas com PBZ tenham menores teores de sacarose, elas também tem um alto potencial osmótico em função da menor quantidade de água presente no seu meio intracelular. Estudos têm mostrado que as SnRK1 são ativadas em resposta ao alta concentração de sacarose ou baixa concentração dos níveis de glucose intracelular (HALFORD et al, 2003), exatamente o que foi visto em nossos dados: alta concentração de sacarose nas plântulas tratadas com GA₃ e baixos teores de glucose nas plântulas tratadas com PBZ. É válido ressaltar que mesmo as plântulas tratadas com PBZ apresentando menores teores de AST e sacarose, ainda assim ocorreu o acúmulo desses compostos, já que as plântulas ainda estão na fase inicial de desenvolvimento.

A Invertase da parede celular (60), geralmente estão ligadas a parede celular, embora existam vários tipos delas em diferentes organelas. As enzimas estão envolvidas em processos catabólicos da sacarose e a hidrólise que ocorre de forma irreversível liberando hexoses (frutose e glucose) (WEBER et al, 1995; KINGSTON-SMITH et al, 1999).

Foi observado por MA et al (2000) há uma associação entre acúmulo de hexose e redução de transcritos relacionados com fotossíntese. Em nosso caso, vimos que tanto, sacarose, como hexoses foram aumentados aos 21 dias de tratamento, assim como o número de transcritos relacionados com a fotossíntese, que pode ser em virtude da precoce idade das plantas e capacidade de utilização e armazenamento desses carboidratos. No entanto, a enzima invertase seria essencial na clivagem extracelular da sacarose para o fornecimento de carboidratos para os tecidos de reserva, via apoplasto, por essa razão elas são mais ativas nos tecidos dreno que em tecidos fonte. De acordo com PRIOUL et al (1990), a baixa atividade desta enzima em órgãos fonte ocorreria, em prol de uma exportação massiva de fotoassimilados.

Estudos em diferentes espécies mostraram que a sacarose sintase (61 e 62) assume o principal papel no metabolismo energético, controlando a mobilização da sacarose em várias vias importantes para o metabolismo e funções de armazenamento na célula da planta (STURM & TANG, 1999). Foi constatado que a resposta dessa enzima ocorre em função do status de carboidratos disponível no meio (KOCK et al, 1992). De acordo com nossos dados, os genes responsáveis codificação da sacarose sintase (62 e 63), foram reprimidos tanto no tratamento como GA₃ quanto no tratamento com PBZ. De acordo com BAUD et al, (2004) genes responsáveis pela codificação da sacarose sintase foram expressos em várias condições (desidratação, deficiência de O_2 , tratamento de baixa temperatura e suprimento de açúcar). O acúmulo de sacarose em determinados tecidos também pode levar à sacarose sintase a produção de polissacarídeos de parede (AMOR et al, 1995; BUCKERIDGE et al, 1999). No entanto nas plantas, a sacarose sintase é mais ativa em tecidos que funcionam como dreno, p.ex, tubérculos, sementes e frutos, já que ela catalisa a degradação da sacarose no floema para transporte de monossacarídeos. Em tecidos dreno, os monossacarídeos podem se acumular (em frutos por exemplo) ou serem utilizados para produzir energia (nas raízes). Os níveis de expressão de sacarose sintase em tecidos dreno estão associados como principal indicador dessa função.

A SPS (63) catalisa a primeira reação da via da síntese da sacarose, transferindo um gurpo glicosil de um açúcar doador ativado, como a uridina difosfato glucose (UDP-Glc), para um açúcar aceptor, como a D-frutose 6-fosfato (F6P), resultando na formação de UDP e D-sacarose 6-fosfato, essa reação é reversível (CHUA et al, 2008). A SPS contém um sítio de fosforilação, que é responsável pela regulação por luz-escuro e é essencial para a ativação da enzima nas plantas (LUNN & MacRAE, 2003; CASTLEDEN et al, 2004; CHUA et al, 2008). A regulação dessa enzima parece estar envolvida com as mais diversas funções, onde sua superexpressão em milho e tabaco, resultaram numa floração precoce e em maior número, além do aumento na atividade fotossintética (CHEN et al, 2005b) e nos teores de sacarose nessas plantas (BAXTER et al, 2003). Em nosso caso, a enzima SPS foi reprimida nos dois tratamentos, no entanto a SPS está associada ao acúmulo de sacarose, e ela deveria estar

ativada, ainda mais se considerarmos que muitos genes da maquinaria fotossintética foram ativados. Isso nos leva a especular que outros genes que codificam a SPS possam ter sido ativados em nosso material, no entanto não foram estudados.

O acúmulo de trealose (64) ocorre em situações de privação de nutrientes, desidratação (Van LAERE, 1989; ADAMS et al, 1990; WIEMKEN, 1990; CROWE et al, 1992). Acredita-se que a trealose participe de importantes papéis como a estabilização de estruturas celulares sob condições de estresse (KELLER et al, 1982; CROWE et al, 1992). A trealose funciona como um osmorregulador durante o estresse, onde ela pode agir armazenando carboidrato (THEVELEIN, 1984; WIEMKEN, 1990). A trealose, em leveduras, parece ter uma importante função de controlar o metabolismo de acúcar através da regulação da glicólise, em especial os níveis de hexoquinases (HOHMANN et al, 1993; BONINI et al, 2003). Em plantas superiores, a trealose raramente ocorre, e se apresenta em nível quase não detectável (BLÁSQUEZ et al, 1998). O gene que codifica a trealose foi induzido nas plântulas tratadas com PBZ e reprimido nas plântulas tratadas com GA₃, sinalizando que as plântulas tratadas com PBZ sofrem estresses diferentes em relação àquelas tratadas com GA₃, o que é totalmente esperado, uma vez que as plântulas tratadas com PBZ apresentam um fenótipo oposto às tratadas com GA₃. De acordo com a literatura, em plantas o aumento da expressão do gene que codifica a trealose está relacionado ao aumento de tolerância ao estresse e também ao ABA, em parte devido a alterações decorrentes da regulação de genes envolvidos com a sinalização de ABA e Glc durante o crescimento vegetativo de plântulas (PILON-SMITHS et al, 1998; GARG et al, 2002; AVONCE et al, 2004). No tratamento com PBZ não houve aumento da expressão de genes que participam da biossíntese do ABA. No entanto, o gene 2, que atua na via de sinalização de ABA foi induzido. É possível que em virtudo do menror acúmulo de água em função de células menores, essas plantas tenham alterado seu potencial osmótico, e nesse sentido, a trealose, pode ser uma enzima chave nas respostas dos genes referente ao tratamento com PBZ.

A Frutose-1, 6-bisfosfatase (65) é uma enzima que catalisa a hidrólise da frutose-1, 6bifosfato em frutose-6-fosfato, essa reação é irreversível, e é considerada como sendo um importante ponto de controle (LUNN & FURBANK, 1999). E a enzima parece ser regulada por diversas vias, como por exemplo, a fotossíntese, ciclo de Calvin (BUCHANAN, 1980), pela luz, pelo sistema ferredoxina/tioredoxina. Ela também parece estar envolvida com a coordenação do status metabólico no estroma do cloroplasto com expressão ou supressão do gene no cloroplasto, assim como no núcleo (ANDERSON & GIBBONS, 2007). Em nossos resultados, vimos que a enzima frutose 1,6 bifosfatase foi reprimida nas plântulas tratadas com GA₃ e induzida pelo PBZ. Os dados mostram um maior acúmulo de sacarose nas plântulas tratadas com GA₃ e sabemos ainda que o PBZ retarda o crescimento. ANDERSON et al (2006) e ANDERSON & GIBBONS (2007), sugerem que a frutose bifosfatase tem a função no núcleo e no cloroplasto como de sensor de açúcar fosfato. Já em cana-de-açúcar, CASU et al (2003) observaram que os transcritos de frutose bifosfatase foram reprimidos em entrenó maduro, sabemos que em nossas condições experimentais não temos ainda colmo diferenciado, para justificar a diminuição no número de transcritos da referida enzima, no entanto vale ressaltar que a quantidade de sacarose e hexoses acumulados nas plântulas tratadas com GA₃ são muito maiores que nas plântulas controle assim como nas plântulas tratadas com PBZ, e poderia estar funcionando como um controle dessa via.

Quanto ao efeito do PBZ, podemos dizer que ele é um composto sintético que atua na via da oxidação do ent-caureno, e inibe a formação do ent-caurenol e do ácido ent-caurenóico (DALZIOL & LAWRENCE, 1984; IZUMI et al, 1985), que são precursores da síntese de GAs. Foi observado que os efeitos obtidos com o crescimento do epicótilo de cana-de-açúcar

foram revertidos com a ação do PBZ. No entanto, é importante salientar o fato de que ao usar o PBZ, não se espera que os resultados relacionados ao metabolismo e expressão gênica sejam todos contrários aos observados com a aplicação de GA₃. Isto porque o PBZ causa uma inibição generalizada da produção de GAs, enquanto no caso do GA₃, o efeito é apenas deste tipo específico de giberelina. Por este motivo, os efeitos do PBZ serão tratados de forma, até certo ponto, independente dos efeitos do GA, pois este tipo de experimento não permite uma comparação direta entre os dois.

Já foi observado que o PBZ alcança os meristemas subapicais da planta causando reduções na taxa de alongamento (sem diminuir o numero de entrenós) e divisão celular do caule, que é, em determinadas culturas, uma vantagem (BEROVA & ZLATEV, 2000; RESENDE & SOUZA, 2002). O PBZ também é capaz de induzir o florescimento sob condições não indutivas (SANTOS et al, 2004). Tem sido demonstrado também que ele protege as plantas de diversos estresses, entre eles, o estresse hídrico, salino e osmótico (ABOU El-KHASHAB, 1997; HAJIHASHEMI et al, 2007; HAJIHASHEMI et al, 2009), baixas e altas temperaturas, luz ultra-violeta (UV), poluição do ar, e por isso tem sido referenciado como multi-protetor. Sua utilização pode diminuir os níveis de etileno, que em nosso caso, todos os genes envolvidos com a sinalização e biossíntese do etileno (exceto da Acc sintase) tiveram o seu número de transcritos reduzidos. O etileno é um hormônio que está envolvido com estresse, e sua ausência também favorece a proteção das plantas (MACKAY et al, 1990). Embora o PBZ atue na inibição da via das GAs, quando nos referimos a expressão gênica observamos que muitos genes respondem de forma similar às plântulas tratadas com GA3, o que muito provavelmente ocorre em função de mecanismos desencadeados pela presença do PBZ em minimizar os efeitos deletérios da ausência total das GAs e os hormônios a elas associados, como por exemplo, AUX, ABA, etileno, entre outros. Os efeitos da utilização de PBZ também se referem a diminuição na massa fresca, (o mesmo pode ser observado na tabela 3), dos teores de açúcares solúveis totais e sacarose (MEHOUACHI et al, 1996; OKUDA et al, 1996; PUIATTI et al, 2005; SILVA, 2008; SILVA & VILELLA, 2008) e um aumento no diâmetro do caule, que nesse caso pode ser justificado pelo aumento na expressão dos genes que codificam a XET (conforme tabela 6D)

HAJIHASHEMI et al (2009), demonstraram que o efeito do PBZ em plantas de trigo diminuiu a altura da planta, comprimento e área foliar. A inibição da altura é uma conseqüência da inibição da síntese de GA, resultando em entrenós menos alongados, o PBZ também reduziu o número e o tamanho das células, tendo como características folhas menores, o que ocasionou diminuição do peso fresco e seco das folhas. Os mesmos efeitos foram observados nas plântulas tratadas com PBZ (tabela 3, figuras 24, 25 e 26). Também foi observado por WANG et al (1986), que a utilização de PBZ altera a constituição da parede celular, diminuindo principalmente os níveis de celulose, que pode ser justificado pela pequena extensão ocorrida na região do caule, devido ao seu limitado crescimento.

As plantas tratadas com PBZ tem uma reduzida capacidade de armazenar água, em virtude do seu limitado tamanho celular, o que acarreta variação no seu potencial osmótico. Mas como conseqüência do menor acúmulo de água, ocorre um aumento na concentração de açúcares no interior da célula. Nossos dados mostraram que vários genes envolvidos com a fotossíntese, fixação de carbono além do metabolismo de carboidratos também tiveram o número de transcritos aumentados, contribuindo com o equilíbrio osmótico da célula, já que é conhecido o efeito benéfico do acúmulo de açúcares. Como a demanda de carboidratos foi pouco utilizada no crescimento da parte aérea da plântula, em função da necessidade do suprimento de água, e devido ao acúmulo de carboidratos e outros componentes celulares, como, poliamidas, aminoácidos, por exemplo, ocorre um investimento da plântula em relação

ao crescimento do sistema radicular, condição observada nas plântulas tratadas com PBZ (figura 25). FLETCHER et al (2000) e HIJIHASHEMI et al (2007), relatam que na presença de PBZ, em função da manutenção do equilíbrio osmótico, condiciona uma inversão da partição de carbono na planta, ocorrendo um investimento no crescimento da raiz, que também pode ser explicado pela variação ocorrida no processo de fotomorfogênese (tabela 3).

Respostas das plântulas tratadas com GA₃ e PBZ a vários fatores de transcrição:

Fica claro, que embora o GA₃ tem tido um sutil efeito na indução desse gene HLH (19), a resposta o GA₃ interfere nos processos celulares de proliferação e diferenciação. Esse gene é responsivo a presença de sacarose no meio celular, e as plântulas tratadas com GA₃ apresentaram maiores teores de AST e sacarose, propiciando uma indução do gene a essa resposta, uma vez que a planta dispõe de "energia" para um aumento nos processos de proliferação e diferenciação celular, além do alongamento celular. Segundo KIM et al (2005), esse gene tem uma função normalizadora no crescimento e desenvolvimento, principalmente em relação ao alongamento celular. Nas plântulas tratadas com PBZ o gene permaneceu nas mesmas condições encontradas nas plântulas controle, o que pode indicar a necessidade da sua expressão para que o efeito do PBZ não seja deletério às plântulas, porque caso o gene fosse reprimido, poderia comprometer de tal forma o tamanho celular que as células poderiam não ter capacidade de manter seus mecanismos de armazenamento de água, energia, entre outros.

Em nosso caso, ambos os tratamentos (GA₃ e PBZ), reprimiram a expressão de MYB (20), vale ressaltar que tanto no tratamento com GA₃ quanto com PBZ, o metabolismo da parede celular encontra-se alterado, no caso de GA₃, esta havendo alongamento da célula, ocasionando o alongamento longitudinal da parede, e em PBZ, as células são mais curtas, no entanto, ocorre expansão radial. Na literatura é conhecido que o aumento da expressão do

referido gene, desencadeia a redução de diversos genes relacionados a alteração da parede celular (MESHI & IWABUCHI, 1995; FERREIRA, 2006; SONBOL, 2009), logo a diminuição de seus transcritos favorecem as alterações desencadeadas pelos dois tratamentos realizados.

De acordo com ZHENG et al (2009), a superexpressão de genes da família NAC (21), incluindo NAM (gene 22 e 24), aumentam a tolerância de plantas ao estresse osmótico e hídrico, e seus efeitos estão relacionados com a formação do meristema apical (SOUER et al, 1996), sinalização para o crescimento (XIE et al, 1999), senescência (GUO et al, 2004), desenvolvimento de flores, folhas, raízes e sementes (GE et al, 2004). Os membros da família NAC são responsivos a sinalização por açúcares, além disso, sua ausência compromete o desenvolvimento causando nanismo, senescência precoce, dramático defeitos no desenvolvimento das folhas. Nossos dados sugerem que em plântulas tratadas com GA_3 a indução da expressão do gene (22) pode ter acontecido em virtude de uma resposta relacionada com o desenvolvimento, especialmente direcionada ao meristema apical do caule, somado a isso, em virtude do acúmulo de açúcar esses genes podem ter contribuído com a regulação osmótica do meio celular, além de uma indução pelas proteínas quinases, fatos constatados na literatura. As plântulas tratadas com PBZ por terem apresentado limitação em seu crescimento caulinar, e como consequência menores teores de carboidratos, seria esperado que a expressão desse grupo de genes fosse reprimida, no entanto, vários fatores podem atuar concomitantemente nessas vias, sugerimos assim que o efeito a indução na expressão do gene (22) pode ser devido a um aumento na expressão de genes do grupo das proteínas quinases, uma vez que essa relação foi mostrada por KLEINOW et al (2009) e sempre precisamos levar em consideração que muito embora o tratamento com PBZ apresente um fenótipo contrário às plântulas tratadas com GA₃, a resposta a nível gênico pode ter uma função de manutenção da viabilidade celular, e respostas esperadas podem ser contrárias numa tentativa de manutenção de funções celulares fundamentais.

Em plântulas de cana-de-açúcar a expressão do gene MADS (21) em ambos os tratamentos foi reprimida (GA₃ e PBZ), que pode ser justificado pela precoce idade das plântulas utilizadas no experimento, apenas 21 dias após a germinação, que são consideradas plantas extremamente jovens para a iniciação floral.

De acordo com dados de NAGASAKI et al (2001), os genes homeobox (26) têm a expressão relacionada com proteínas que tem a expressão diminuída ao longo do desenvolvimento. Em plantas adultas de cana-de-açúcar o KNOTTED1 tem sua expressão diminuída a medida que houve o amadurecimento do colmo (PAPINI-TERZI, 2005). O GA₃ exerce efeito no desenvolvimento das plântulas, e conforme observado em nossos dados, acelera o acúmulo de carboidratos e aumenta esses teores, promove um crescimento tanto mais rápido quanto maior da região caulinar, e de acordo com a literatura, esses fatores são importantes reguladores para a modulação do gene, diminuindo sua expressão. No tratamento com PBZ devemos observar que embora o gene tenha diminuído sua expressão, o valor da expressão gênica de PBZ foi mais que o dobro em relação às plântulas tratadas com GA₃, e conforme já mencionado em nossos dados o PBZ retarde o crescimento das plântulas de canade-açúcar, e esse gene diminua sua expressão ao longo do desenvolvimento, conforme relatado na literatura, o efeito causado nas plântulas com PBZ parece estar relacionado com o desenvolvimento da planta, que esta sendo afetado, e outros genes também mostram esse efeito.

Os fatores de transcrição são genes envolvidos com respostas geradas no início da cadeia de sinalização, e o efeito do GA₃ e a ausência das diversas GAs (tratamento com PBZ) afetaram diversos desses genes, que em sua grande maioria foram reprimidos. Retardando

principalmente o efeito da senescência que no tratamento com GA₃, é um efeito conhecido em cana-de-açúcar e no tratamento com PBZ pode ser explicado em função da tentativa da plântula equilibrar a homeostasia celular, pois ocorrendo a soma de todos os efeitos da ausência de GAs a planta poderia morrer, mostrando dessa forma que muito provavelmente tanto a presença de GA₃ quanto a ausência de GAs afetam o processo da fotomorgênese, onde o curso do desenvolvimento natural da plântulas foi modificado.

Na figura 28, podemos sintetizar as principais relações entre o que vimos no fenótipo, bioquímica e genética das plântulas tratadas com GA₃ e PBZ: nas plântulas tratadas com GA₃, foi observado um fenótipo totalmente contrário às plântulas tratadas com PBZ, ou seja, região caulinar alongada (dados que podem ser vistos nos cortes histológicos), que ocorreu principalmente em função do alongamento celular e o intenso processo mitótico. Esse efeito pode ter sido desencadeado pelos genes: da AUX, HLH, NAM, Ribonuclease I, histona H2B4, além dos genes da XET e expansinas. Todos esses processos, demandam um alto poder energético das plântulas que é atendido, em função da indução de diversos genes da via fotossintética e fixação de carbono, que reflete diretamente no acúmulo de carboidratos e estes sinalizam para que ocorram ajustes fisiológicos de diversos outros genes, como as aquaporinas e deidrinas. No caso das plântulas tratadas com PBZ, a ausência de GA, desencadeou diversas respostas relacionadas com alterações da biossíntese da parede celular, que atuou em função da expansão radial, que pode ser observado através da expressão da PAL, Ces e da XET além da AUX e do DELLA, que também favorece variações na parede celular, que em virtude disso refletiu no metabolismo de carboidratos, que ocorreu em função da indução de genes relacionados com a fotossíntese e fixação de carbono, além dos genes envolvidos com o transporte de monossacarídeos, da aquaporina presente no tonoplasto e da P450.



Relação entre os dados da aplicação de GA3 e PBZ no metabolismo de carboidratos:

Figura 28. Resumo da interrelação entre efeitos causados pela aplicação de GA₃ e de PBZ nas plântulas de cana-de-açúcar com 21 dias de tratamento, cultivadas *in vitro*. AUX=auxina; FS = fotossíntese; HLH e NAM= fatores de transcrição; MIP = membrane intrisic protein; TIP= tonoplast intrinsic protein; MFS = transportador de monossacarídeos; EXP= expansina; CAB = PSI; PEPC= fosfenolpiruvato carboxilase; POFD = piruvato ortofosfodikinase; TFI = triose fosfato isomerase; BG= beta glucosidase; FBF = frutose bifosfatase; K= kinases; Ani = anidrase carbônica; Aco = aconitase; Ter = trealose; PAL= fenilalanina amônia-liase.

Na figura 29, temos um resumo vista de uma forma mais ampla no metabolismo das plântulas de cana-de-açúcar tratadas com $GA_3 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e com PBZ. A presença de $GA_3 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e do PBZ atuam na expressão de genes relacionados com a biossíntese e via de transcrição de sinais dos hormônios, que atuam de forma generalizada na regulação gênica de vários genes relacionados com o desenvolvimento vegetal, estrutura foliar, estrutura do cloroplasto, na eficiência fotossintética, que atua na fotossíntese e finalmente no acúmulo de biomassa.



Figura 29 Resumo vista de uma forma mais ampla no metabolismo das plântulas de cana-de-açúcar tratadas com $GA_3 0,5 mg.L^{-1} e com PBZ$.

6. CONCLUSÕES

- O GA₃ influencia o acúmulode carboidratos (AST, AR e sacarose), e quanto a concentração utilizada maiores os teores de açúcares acumulados (exceto a concentração 20 mg.L⁻¹).
- Na presença de GA₃ ocorre alteração da partição (relação fonte:dreno) das plântulas em relação ao tempo de tratamento, alterando o processo de fotomorfogênese das plântulas.
- O GA₃ e o PBZ alteram os aspectos morfológicos das plântulas, favorecendo o alongamento celular e a expansão radial das células, respectivamente.
- Não ocorre alteração da constituição da parede celular na presença de GA₃.
- O GA3 e PBZ alteraram o nível de transcritos de diversos genes pertencentes a diferentes vias metabólicas, tais como: genes relacionados com a biossíntese e via de transdução de sinal dos hormônios (DELLA, AUX, ácido jasmônico, etileno e ABA), metabolismo da parede celular (XTH, expansinas, PAL, celulose sintase), genes relacionados com a fotossíntese (PEPC, anidrase carbônica, aconitase, triose fosfato isomerase, PSI), metabolismo de carboidratos (kinases, beta-glucosidase, trealose), estresse osmótico (aquaporinas, deidrina, PS450), ciclo celular (nuclease I e histonas), também atuam na expressão de alguns fatores de transcrição (NAM e HLH).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACH, H.; BODE, H.; ROBINSON, D. G. & GRAEBE, J. E., 1997. ent-Kaurene synthetase is located in proplastids of meristematic shoot tissues. Planta 202:193-211
- ABE, M.; KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO S, ET AL, 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. Science 309: 1052–1056.
- ABI APPLIED BIOSYSTEMS, 2006. Classical Block PCR & RTPCR. Real time PCR Vs. tradicional PCR, tutorial. Disponível em: http://www.gene-quantification.info/
- ABOU EL-KHASHAB, A. M., 1991. Increased salt-tolerant by means of growth regulators in some young fruit trees. MS thesis, Tanta University, Egypt Abou El-Khashab AM, El-Sammak AF.
- ADAMS, A.; NAKAGAWA, T., SWANSON, M. S., WOODRUFF, T. K. & DREYFUSS, G., 1990. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. Mol Cell Biol 6, 2932–2943.
- ALONI, B.; DAIE J. & WYSE, R., 1986. Enhancement of ['4C]sucrose export from source leaves of Vicia faba by gibberellic acid. Plant Physiol 82: 962-966
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG J.; ZHANG Z.; MILLER
 W. & LIPMAN D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-402.
- AMOR, Y.; HAIGLER, C. H.; WAINSCOTT, M. & DELMER, D., 1995. A membraneassociated form of SuSy and its potential role in the synthesis of cellulose and callose in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 9353-9357.
- ANDERSON, L. E. & GIBBONS, J. T., 2007. Effect of leaf position on levels of the chloroplast and cytosolic fructose bisphosphatase isozymes in the pea leaf nucleus. Protoplasma. 231: 113–121

- ANDERSON, L. E.; CAROL, A. A.; GIBBONS, J. T., 2006. Effect of leaf position on levels of the chloroplast and cytosolic phosphofructoaldolase isozymes in the pea leaf nucleus. Int J Plant Sci 167: 257–268
- ANDREWS, J.; BOUFFARD, G. G. CHEADLE, C.; LU, J.; BECKER, K. G. & OLIVER,
 B., 2000. Gene discovery using computational and microarray analysis of transcription in
 the Drosophila melanogaster testis. Genome Research 10:2030-2043
- APPLEFORD, N. E.; EVANS, D. J.; LENTON, J. R.; GASKIN, P.; CROKER, S. J. et al. 2006. Function and transcript analysis of gibberellin-biosynthetic enzymes in wheat. Planta 223:568–82
- ARTECA, R. N., 1996. Plant growth substances: principles and applications. New York: Chapman & Hall, 322p.
- AVONCE, N.; LEYMAN, B.; MASCORRO-GALLARDO2, J. O.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M. & ITURRIAGA, G., 2004. The Arabidopsis Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 Gene Is a Regulator of Glucose, Abscisic Acid, and Stress Signaling. Plant Physiology.
- BANINASAB, B. & MOBLI, M., 2008. Effects of plant growth regulators on growth and carbohydrate accumulation in shoots and roots of two almond rootstock seedlings. FRUITS, v.63(6):363-370.
- BARRY, G. F., CHEIKH, N., KISHORE, G. M.,1998. Expression of fructose-1,6bisphosphate aldolase in transgenic plants for improved crops with better solids uniformity by improving carbon availability. PCT Int Appl WO 9858069(Al):77, 22-26
- BATE, N. J.; NIU. X.; WANG, Y.; REIMANN, K. S. & HELENTJARIS, T. G., 2004. An invertase inhibitor from maize localizes to the embryo surrounding region during early kernel development. Plant Physiol. 134: 246-254.
- BAUD, S.; VAULTIER, M. N. & ROCHAT, C., 2004. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis. J. Exp. Bot. 55: 397-409.

- BECKETT, D., 2001. Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation. J. MOL.BIOL. Vol.314(3):335-352
- BEROVA & ZLATEV, 2000. Physiological response and yield of paclobutrazol treated tomato plants. Plant Growth Regulation, V. 30, N. 2
- BEWLEY, J. D., 1997. Seed germination and dormancy. The Plant Cell, Rockville, v.9, n.3, p. 1055-1056.
- BIAŁECKA, B. & KEPCZYNSKI, J., 2007. Changes in concentrations of soluble carbohydrates during germination of Amaranthus caudatus L. Seeds in relation to ethylene, gibberellin A3 and methyl jasmonate. Plant Growth Regul. 51:21–31
- BLAZQUEZ, M. A.; SANTOS E; FLORES C. L.; MARTI'NEZ-ZAPATER, J. M.; SALINAS J.; GANCEDO, C.; 1998. Isolation and molecular characterization of the Arabidopsis TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. Plant J 13: 685–689
- BLEECKER, A.B., 1998. The evolutionary basis of leaf senescence: method to the madness? Curr Opin Plant Biol 1: 73–78
- BONINI, B. M.; VAN, DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M., 2003. Uncoupling of the glucose growth defect and the deregulation of glycolysis in Saccharomyces cerevisiae Tps1 mutants expressing trehalose-6-phosphate-insensitive hexokinase from Schizosaccharomyces pombe. Biochim Biophys Acta 1606: 83–93
- BORISJUK, L.; ROLLETSCHEK, H.; WOBUS, U. & WEBER, H., 2003. Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. J. Exp. Bot. 54: 503-512.
- BORISJUK, L.; WALENTA, S.; ROLLETSCHEK, H.; MUELLER-KLIESER, W.; WOBUS,U. & WEBER, H., 2002. Spatial analysis of plant metabolism: sucrose imaging withinVicia faba cotyledons reveals specific developmental patterns. Plant J. 29: 521-530.
- BOWLES, D.; ISAYENKOVA, J.; LIM, E., POPPENBERGER, B., 2005. Glycosyltransferases: managers of small molecules. Curr Opin Plant Biol 8: 254–263

- BRANCO, D. S., 2008. Sinalização por carboidratos em cana-de-açúcar. Campinas, SP. 203 pag.
- BRZOBOHATY, B.; MOORE, I.; KRISTOFFERSEN, P.; BAKO, L.; CAMPOS, N.; SCHELL, J., PALME, K., 1993. Release of active cytokinin by a b-glucosidase localized to the maize root meristem. Science 262: 1051–1054
- BUCKERIDGE, M. S.; VERGARA, C. E. & CARPITA, N. C., 1999. The mechanism of synthesis of a cereal mixed-linkage (β-1,3),(β-1,4) β-D-glucan: Evidence for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex. Plant Physiol. 120: 1105-1116.
- BURSTIN, J. 2000. Differential expression of two barley XET-related genes during coleoptile growth. Journal of Experimental Botany 51, 847–852
- BUSATO, A. P.; VARGAS-RECHIA, C. G. & REICHER, F., 2001. Xyloglucan from the leaves of Hymenaea courbaril. Phytoch. 58: 525-531.
- BUSTIN, S. A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinol (Bradley Stoke). 29: 23-29.
- BUSTIN, S. A., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. J. Mol. Endocrinol (Bradley Stoke). 29: 23-39.
- BUSTIN, S. A., 2005. Quantificative real-time PCR (RT-PCR): a perspective. J. Mol. Endocrinol (Bradley Stoke). 34:597-601.
- CADERAS, D.; MUSTER, M.; VOGLER, H.; MANDEL, T.; ROSE. J. K.; MCQUEEN-MASON, S., KUHLEMEIER, C., 2000. Limited correlation between expansin gene expression and elongation growth rate. Plant Physiol 123: 1399–1414
- CANO-MEDRANO, R. DARNELL, RL., 1997. Sucrose metabolism and fruit growth in parthenocarpic vs. seeded blueberry (Vaccinium ashei) fruits. Physiol Plant 99:439–446
- CARVALHO, R.F., 2007. Estudo da interação entre fitocromo e hormônios vegetais no controle do desenvolvimento. Piracicaba, tese de doutorado, 107 p.

- CASAGRANDE, A.A., 1991. Tópicos de morfologia e fisiologia da cana -de-açúcar. Jaboticabal: UNESP. 157p.
- CASTLEDEN, C. K.; AOKI, N.; GILLESPIE, V. J.; MACRAE, E. A.; QUICK, W. P.; BUCHNER, P.; FOYER, C.H.; FURBANK, R.T.; & LUNN, J.E., 2004. Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. Plant Physiol. 135: 1753–1764.
- CASU, R E.,; DIMMOCK, C.; CHAPMAN, S.; GROF, C.; McINTYRE, C. L.; BONNETT,G. & MANNERS, J., 2004. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. Pl Mol Biol 54: 503-517
- CASU, R. E.; GROF, C. P. L.; RAE, A. L.;, McIINTYRE, C. L.; DIMMOCK, C. M. & MANNERS, J. M., 2003. Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. Pl Mol Biol 52:371-386
- CASU, R. E.; MANNERS, J. M.; BONNETT, G. D.; JACKSON, P. A.; INTYRE, C. L.; DUNNE, R.; CHAPMAN, S. C.; RAE, A. L. & GROF, C.P.L., 2005. Genomics approaches for the identification of genes 159 determining important traits in sugarcane. Field Crops Res 92:137-147
- CATALA, C.; ROSE, J. K.; BENNETT, A. B., 2000. Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. Plant Physiol 122: 527–53
- CHEIKH, N., 1981. Effect of growth regulators on phloem exudation from excised tomato shoots (Lycopersicon esculentum Mill). GA3 effect on partitioning of labeled photoassimilates. Master's thesis. University of Minnesota, St. Paul, MN
- CHEIKH, N., 1991. Study of some control mechanisms of biosynthesis of nonstructural carbohydrates. Role of plant hormones. PhD thesis. University of Minnesota, St Paul, MN

- CHEN, W. S.; LIU H.Y.; YANG, L.; CHEN W.H., 1994. Gibberellin and temperature influence carbohydrate content and flowering in Phalaenopsis. Physiol Plant 90:391–395
- CHO, H. T.; KENDE, H., 1997a. Expansins and intermodal growth of deepwater rice. Plant Physiol 113: 1145–1151
- CHO, H. T.; KENDE, H., 1997b. Expansins in deepwater rice internodes. Plant Physiol 113: 1137–1143
- CHUA, T. K.; BUJNICKI, A. J. M.; TIEN-CHYE TAN B. C.; HUYNH, A. F., PATEL, D. B.
 K. D. & SIVARAMAN, J., 2008. The Structure of Sucrose Phosphate Synthase from Halothermothrix orenii Reveals Its Mechanism of Action and Binding Mode. The Plant Cell, Vol. 20: 1059–1072,

COHEN, P. & COHEN, P. T., 1989. J. Biol. Chem. 264, 21435-21438.

COHEN, P., 1989. Annu. Rev. Biochem. 58, 453–508

COPELAND, L., 1990. Enzymes of sucrose metabolism. Met. Plant Bioch. 3: 73-85.

CORBETT, RESEARCH, 2007. ROTOR GENE 3000. Real Time Summary: Overview of the Chemistries and Optimizations, version 1.7. Mortlake. Disponível em: http://www.corbettlifescience.com

COSGROVE, D. J., 2005. Growth of the plant cell wall. Mol. Cell Biol. 6: 850-861.

COUSINS, A. B.; BADGER, M. R. & VON CAEMMERER, S., 2006. Carbonic Anhydrase and Its Influence on Carbon Isotope Discrimination during C4 Photosynthesis. Insights from Antisense RNA in Flaveria bidentis. Plant Physiology, May 2006, Vol. 141, pp. 232–242 Farquhar GD (1983) On the nature of carbon isotope discrimination in C4 species. Aust J Plant Physiol 10: 205–226.

CROSS, B. E., 1960. Journal Chem. Soc. 3022.

CROSS, B. E.; GROVE, J. F.; MacMILLAN, J.; MOFFAT, J. S.; MULHOLLAND, T. P. C.; SEATON, J. & SHEPPAND, N., 1959. Proc. Chem. Soc. 302

- CROWE, J. H.; HOEKSTRA, F. A. & CROWE, L. M., 1992. Anhydrobiosis. Annu Rev. Physiol. 54:579-599
- CUI1, D.; NEILL2, S. J.; TANG1, Z. & CAI, W., 2005. Gibberellin-regulated XET is differentially induced by auxin in rice leaf sheath bases during gravitropic bending. Journal of Experimental Botany 2005 56(415):1327-1334
- CZJZEK, M.; CICEK, M.; ZAMBONI, V.; BURMEISTER, W. P.; BEVAN, D. R., HENRISSAT, B.; ESEN, A., 2001. Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) b-glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl b-Dthioglucoside. Biochem J 354: 37–46
- DALZIOL, J.; LAWRENCE, D. K., 1984. Biochemical and biological effects of kaurene oxidase inhibitors, such as paclobutrazol. In R Menhenett, DK Lawrence, eds, Biochemical Aspects ofSynthetic and Naturally Occurring Plant Growth Regulators, Monograph British Plant Growth Regulation Group, Wantage, England, pp 43-57
- DARLEY, C. P.; FORRESTER, A. M. & MCQUEEN-MASON, S. J., 2001. The molecular basis of plant cell extension. Plant Mol. Biol. 47: 179-195.
- DAVIS, T. D.; STEFFENS, G.L. & SANKHALA, N., 1988. Triazole plant growth regulators. Horticultural Reviews, v.10, p.63-105.
- DELGADO, R. R.; RODRIGUEZ, R. & CASAMAYOR, R., 1995. Empleo de paclobutrazol em plantas de lima persa sobre naranjo trifoliado 'Rubdoux' a altas densidades. Agrícola Vergel, p.121-125.
- DILL, A.; JUNG, H.S. & SUN, T. P. 2001. The DELLA motif is essential for gibberellininduced degradation of RGA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 14162–14167.
- DREIER, L.P.; HUNTER, J. J.; RUFFNER, H. P., 1998. Invertase activity, grape berry development and cell compartmentation. Plant Physiol Biochem 36:865–872

- DUBOIS, M.; GILLES, A.; HAMILTON, J. K.; ROBERS, P. A.; SMITH, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. (Washington). 28:350-355.
- EPSTEIN, C. B. & BUTOW, R. A., 2000. Microarray technology enhanced versatility, persistent challenge. CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY Volume: 11(1):36-41.
- FEINGOLD, D.S.; BARBER, G.A., 1990. Nucleotide sugars, in: P.M. Dey (Ed.), Methods in Plant Biochemistry, vol. 2, Academic Press, London, pp. 39–78.
- FELIX, J. M., 2006. Análise da expressão gênica envolvida no metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar (Saccharum spp). Campinas, SP. 174 pag.
- FLETCHER, R. A.; GILLEY, A.; SANKLA, N. & DAVIS, T. D., 2000. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. Horticultural Reviews, v.24, p.55-138
- FRANCIS, D. & HALFORD, N.G., 2006. Nutrient sensing in plant meristems, Plant Mol. Biol. 60, pp. 981–993. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (18)
- FRY, S. C.; SMITH R, C.; RENWICK, K. F.; MARTIN, D. J.; HODGE, S. K. & MATTHEWS, K. J. 1992. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. Biochem. J. 282: 821-828.
- GARBERS, C.; DELONG, A.; DERUERE, J.; BERNASCONI, P.; SOLL, D., 1996. A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in Arabidopsis. EMBO J 15: 2115–2124.
- GARG, A. K.; KIM, J. K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; CHOI, Y. D.; KOCHIAN, L. V.; WU, R., 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. Proc Natl Acad Sci USA 99: 15898–15903.
- GATZ, C., 1997. Chemical control of gene expression. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 89-108

- GAZZARRINI, S. & MCCOURT, P. 2003. Cross-talk in plant hormone signalling: What Arabidopsis mutants are telling us. Ann. Bot. (Lond.) 91: 605–612.
- GE, L. et al, 2004. Overexpression of OsRAA1 causes pleiotropic phenotypes in transgenic rice plants, including altered leaf, flower, and root development and root response to gravity. Plant Physiol. 135, 1502-1513.
- GIBEAUT, D. M.. 2000. Nucleotide sugars and glucosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides, Plant Physiol. Biochem. 38, 69–80.
- GIBEAUT, D. M.; CARPITA, N. C., 1994.Biosynthesis of cell wall polysaccharides, FASEB J. 8 904–915.
- GIFFORD, R. M. & EVANS, L. T., 1981. Photosynthesis, carbon partitioning, and yield. Annu Rev Plant Physiol 32: 485-309
- GOMES, F. P., 1990. Curso de Estatística Experimental. 13ª ed., Livraria Nobel, Piracicaba, 467 p.
- GRAEBE, J. E., 1987. Gibberellin biosynthesis and control. Annu. Rev. Plant. Physiol., v. 38, p.419-465.
- GREENBERG, J.; GOLDSCHMIDT, E.E. & GOREN, R., 1993. Potential and limitations of the use of paclobutrazol in citrus orchards in Israel. ActaHorticulturae, v.329, p.58-61.
- GRIFFITHS, J.; MURASE, K.; RIEU, I.; ZENTELLA, R.; ZHANG, Z. L.; POWERS, S. J.;
 GONG, F.; PHILLIPS, A. L.; HEDDEN, P.; SUN, T. P. & THOMAS, S. G., 2006.
 Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. Plant Cell 18: 3399–3414.
- GRIVET, L. & ARRUDA, P., 2001. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. Current Opinion in Plant Biology 5:122–127
- GROSS, W.; LENZE, D.; NOWITZKI, U.; WEISKE, J.; SCHNARRENBERGER, C., 1999. Characterization, cloning, and evolutionary history of the chloroplast and cytosolic class I aldolases of the red alga Galdieria sulphuraria. Gene 230:7–14.

- GROSSI, et al., 2005. Effects of paclobutrazol on growth and fruiting characteristics of Pitanga ornamental pepper Acta Horticulturae, n. 683: 333-336
- GUNDLACH, H.; MULLER, M. J.; KUTCHAN, T.; ZENK, M. H., 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proc Natl Acad Sci USA. 89: 2389-2393.
- GUO, Y.; CAI, Z. & GAN, S., 2004. Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. Plant Cell and Environment 27, 521-549.
- GURALNICK, L. J.; KU, M. S. B.; EDWARDS, G. E.; STRAND, D.; HOCKEMA, B.;
 EARNEST, J., 2001. Induction of PEP carboxylase and Crassulacean acid metabolism by gibberellic acid in Mesembryanthemum crystallinum. PLANT AND CELL PHYSIOLOGY Volume: 42 Issue: 2 Pages: 236-239 torna functional nas folhas.
- HALFORD, N. G. & PAUL, M. J., 2003. Carbon metabolite sensing and signalling, Plant Biotechnol. J. 1, pp. 381–398. Full Text via CrossRef
- HARTWECK, L. M. & OLSZEWSKI, N.E., 2006. Rice GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 is a gibberellin receptor that illuminates and raises questions about GA signaling. Plant Cell 18: 278–282.
- HAYASHI, S, TANABE K., 1991. Basic knowledge of fruit tree culture. Association Agriculture Press, Tottori, Japan
- HELLIWELL, C. A, Sullivan JA, Mould RM, Gray JC, Peacock WJ, Dennis ES. 2001. A plastid envelope location of Arabidopsis ent-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. Plant J. 28:201–8
- HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GOUVÊA, C. F. & BASSO, L. H., 2002. Ação fisiológica de hormônios vegetais na condição hídrica, metabolismo e nutrição mineral.
 In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A. & KLUGE, R. A. Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal. Maringá: Eduem, cap. 9, p. 139-158.

- HOHMANN, S.; NEVES, M. J.; DE KONING, W.; ALIJO, R.; RAMOS, J.; THEVELEIN, J.
 M., 1993. The growth and signalling defects of the ggs1 (fdp1/byp1) deletion mutant on glucose are suppressed by a deletion of the gene encoding hexokinase PII. Curr Genet 23: 281–289.
- HOUDE, M.; BELCAID, M.; OUELLET, F.; et al., 2006. Wheat EST resources for functional genomics of abiotic stress. BMC GENOMICS. Vol.7: 149
- HUERTA, L.; FORMENT, J.; GADEA, J.; FAGOAGA, C.; PENHA, L.; PEREZ-AMADOR,
 M. & GARCIA-MARTINEZ, J. L., 2008. Gene expression analysis in citrus reveals the role of gibberellins on photosynthesis and stress. Plant, Cell and Environment. 31, 1620–1633
- ISHIMARU, M. & KOBAYASHI, S., 2002. Expression of a xyloglucan endotransglycosylase gene is closely related to grape berry softening. Plant Sci. 162: 621-628.
- ITOH, H, Ueguchi-Tanaka M, Sentoku N, Kitano H, Matsuoka M, Kobayashi M. 2001. Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 β-hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:8909–14
- IWAHORI, S. & TOMINAGA, S. , 1986. Increase in first-flush flowering of 'Meiwa'kunquat, Fortunella crassifolia Swingle, trees by paclobutrazol. Scientia Horticulturae, v.28, p.347-353.
- IZUMI, K, KAMIYA Y, SAKURAI A, OSHIO H, TAKAHASHI N., 1985 Studies the site of action of new plant growth retardant (E)-1-(4-chlorophenyl)-4, 4-dimethyl-2-(1, 2, 4 triazoles-1-penten-3-ol) (ss-3307) and comparative effect of its sterioisoterms in a cell free system from Cucurbita maxima. Plant Cell Physiol 26:821–827
- JAIN, M.; NIJAHAWAN, A.; TYAGI, A. K. & KHURANA, J. P., 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications 345, 646–651

- JANSSENS, V.; GORIS, J., 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. Biochem J 353: 417–439.
- JOHANSEN, D. A., 1940. Plant Microtechnique. New York, McGraw-Hill. 523p.
- JOHANSSON, A. H.; STERKY, B. F.; AMINI, B. B.; LUNDEBERG, B. J.; KLECZKOWSKI. L. A., 2002. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding poplar UDP-glucose dehydrogenase, a key gene of hemicellulose/pectin formation. Biochimica et Biophysica Acta 1576, 53–58
- KANAI, R., EDWARDS, G. E., 1999. The biochemistry of C4 photosynthesis. In R Sage, RMonson, eds, C4 Plant Biology. Academic Press, San Diego, pp 49–87.
- KARNOVSKY, M. J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolarity for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology, v. 27, p:137A-138A.
- KAUR, S.; GUPTA, A. K. & KAUR, N., 2000. Effect of GA3, kinetin and indole acetic acid on carbohydrate metabolism in chickpea seedlings germinating under water stress. Plant Growth Regulation 30: 61–70, 2000.
- KELLER, F.; SCHELLENBERG, M. & WIEMKEN, A., 1982. Localization of trehalose in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast. Arch Microbiol. 131:298-301
- KIM, J. A; YUN, J.; LEE, M.; KIM, Y.S.; WOO, J.C.; PARK, C. M., 2005. A basic helix-loop-helix transcription factor regulates cell elongation and seed germination.MOLECULES AND CELLS Volume: 19 Issue: 3 Pages: 334-341
- KIMURA, K; NUMATA, T.; KARUTA, Y. & KIMURA, M., 2004. Amino acids conserved at the C-terminal half of the ribonuclease T2 family contribute to protein stability of the enzymes. Biosci. Biotechonol. Biochem. 68(8) 1748-1757.
- KINGSTON-SMITH, A. H.; WALKER, R. P. & POLLOCK, C. J., 1999. Invertase in leaves: conundrum or control point? J. Exp. Biol. 50: 735-743.

- KINGSTON-SMITH, A. H.; WALKER. R. P. & POLLOCK C. J., 1999. Invertase in leaves: conundrum or control point? J. Exp. Biol. 50: 735-743.
- KLEINOW, T. A.; HIMBERT, A. S.; KRENZ, A. B. R.; JESKE, H. A.; NAC, C. K., 2009 domain transcription factor ATAF1 interacts with SNF1-related kinases and silencing of its subfamily causes severe developmental defects in Arabidopsis Plant Science 177, 360– 370
- KOCH, K. E. & ZENG, Y. 2002. Molecular approaches to altered C partitioning: genes for sucrose metabolism. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127: 474-483. Lee HS and Sturm A. 1996. Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. Plant Physiol. 112: 1513-1522.
- KOCH, K. E.; NOLTE, K. D.; DUKE, E. R.; MCCARTY, D. R. & AVIGNE, W. T., 1992.Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. Plant Cell 4: 59-69.
- KODA, Y., 1992. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. Int Rev Cytol. 135:155-99. Siedow J.N.. Plant lypoxigenases: structure and function. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio. 42: 145-188.
- KONISHI, H.; YAMANE, H.; MAESHIMA, M.; KOMATSU, S., 2004. Characterization of fructose-bisphosphate aldolase regulated by gibberellin in roots of rice seedling. Plant Mol Biol 56:839–848.
- KRAUSS, J. E. & ARDUIN, M., 1997. Manual básico de Métodos em Anatomia Vegetal.Rio de Janeiro: EDUR (Ed. Universidade Rural). 198p.
- KUIPER D., 1993. SINK STRENGTH ESTABLISHED AND REGULATED BY PLANT-GROWTH REGULATORS. PLANT CELL AND ENVIRONMENT Vol.16(9):1025-1026
- LEITE, V. M.; ROSOLEM, C. A. & RODRIGUES, J. D., 2003. Gibberellins and cytokinin effects on soybean growth. Scientia Agricola, Piracicaba, v. 60, n.3, p. 537-541.

- LIM, E. K. & BOWLES, D. J., 2004. A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. EMBO J 23: 2915–2922
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative RCR and the 2(- Delta Delta C(T)) Method. Methods. 25:402-408.
- LOEWUS, F. A.; DICKINSON, D. B.; CYCLITOLS, LOEWUS, F.A.; TANNER, W., 1982. (Eds.), Plant Carbohydrates, Springer-Verlag, Berlin, pp. 193–216.
- LOLIS, E.; ALBER, T.; DAVENPORT, R. C.; ROSE, D.; HARTMAN, F. C.; PETSKO, G. A., 1990. Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-A resolution. Biochemistry 29 6609-18.
- LUEKING, A.; HORN, M.; EICKHOFF, H.; BUSSOW, K.; LEHRACH, H. & WALTER, G., 1999. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. Analytical Biochemistry 270:103-111
- LUNN, J. E. & MACRAE, E., 2003. New complexities in the synthesis of sucrose. Curr. Opin. Plant Biol. 6: 208–214.
- LUNN, J.E., 2002. Evolution of sucrose synthesis. Plant Physiol. 128: 1490–1500.
- MA, H.; SCHULZE, S.; LEE, S.; YANG, M.; MIRKOV, E;, IRVINE, J.; MOORE, P. & PATERSON, A., 2003. An EST survey of the sugarcane transcriptome. Theoretical and Applied Genetics 108: 851-863
- MA, Q.; Dai, X.; Xu Y.; Guo, J.; Liu Y.; Chen, N.; Xiao, J.; Zhang, D.; Xu, Z.; Zhang, X.; Chong, K., 2009. Enhanced Tolerance to Chilling Stress in OsMYB3R-2 Transgenic Rice Is Mediated by Alteration in Cell Cycle and Ectopic Expression of Stress Genes. PLANT PHYSIOLOGY. Vol. 150(1): 244-256.
- MacMILLAN, J., 2002. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. J.Plant Growth Regul. 20:387–442
- MAGALHÃES, A.C.N. 1987. Ecofisiologia da cana-de-açúcar; aspectos do metabolismo do carbono na planta. In: CASTRO, P.R.C., FERREIRA, S.O., YAMADA, T.Y. (ed.) Ecofisiologia da produção agrícola. Piracicaba: POTAFOS. p.113-118.
- MAHOUACHI, J.; IGLESIAS, D. J.; AGUSTÍ, M. & TALON, M., 2009. De coincides with previous increases in carbohydrate and gibberellin concentrations. Plant Growth Regul., 2009. 58:15–23
- MATAA, M.; TOMINAGA, S. & KOSAKI, I., 1998. Relative effects of growth retardant (Paclobutrazol) and water-stress on tree growth and photosynthesis in Ponkan (Citrus reticulata Blanco). Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, v.67, p.28-34.
- MATSUOKA, M., 1995. The gene for pyruvate, orthophosphate dikinase in C4 plants: structure, regulation and evolution. : Plant Cell Physiol. 1995 Sep;36(6):937-43.
- MAUREL, C.; TACNET, F.; GUCLU, J.; GUEM, J.; RIPOCHE, P., 1997. Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. Proc Natl Acad Sci USA 94:7103-7108.
- MAYER, M.P. & BUKAU, B., 2005. Hsp70 chaperones Sousa, R., and Lafer, E.M., 2006. Keep the traffic moving: mechanism of the Hsp70 motor. Traffic 7, 1596–1603.
- McCREADY, R. M.; WALTER, E. D. & MACLAY, W. D., 1950. Sugar of citrus juices. Food Technol-Chicago (Chicago). 4(1):19-20.
- MCGINNIS, K. M.; THOMAS, S. G.; SOULE, J. D.; STRADER, L.C.; ZALE, J. M.; SUN, T.-P. & STEBER, C.M., 2003. The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. Plant Cell 15: 1120–1130.
- MCQUEEN-MASON, S. J. & COSGROVE, D. J., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6574-6578.
- MCQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D. M. & COSGROVE, D. J., 1992. Plant Cell 4, 1425-1433.

- MELO, J. O. F.; DONNICI, C. L.; AUSGUSTI, R.; et al., 2006. 1.2.3-triazolic heterocycles: History, preparations, applications and pharmacological activities.QUIMICA NOVA Vol.29(3):569-579.
- MENKE, F.L.; VAN PELT, J.A.; PIETERSE, C.M. & KLESSIG, D.F., 2004. Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in Arabidopsis. Plant Cell 16: 897–907.
- MESHI, T. & IWABUCHI, M., 1995. Plant transcription factors. Plant Cell Physiol., 36(8):1405-1420.
- MESKIENE, I.; BAUDOUIN, E.; SCHWEIGHOFER, A.; LIWOSZ, A.; JONAK, C.; RODRIGUEZ, P. L.; JELINEK, H. & HIRT, H., 2003. Stress-induced Protein Phosphatase 2C Is a Negative Regulator of a Mitogen-activated Protein Kinase. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 278, No. 21, Issue of May 23, pp. 18945–18952.
- MIYAMOTO, K, UEDA J, KAMISAKA S., 1993. Gibberellin-enhanced sugar accumulation in growing subhooks of etiolated Pisum sativum seedlings. Effects of Gibberellic acid, indolacetic and aycloheximide on invertase activity, sugar accumulation and growth. Physiol Plant 88:301–306
- MOORE, P. H., 2005. Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: towards developing an understanding of the gene-to-crop continuum. Field Crops Research 92:119-135.
- MOORE, B.; ZHOU, L.; ROLLAND, F.; HALL, Q.; CHENG, W. H.; LIU, Y. X.; HWANG, I.; JONES, T.; SHEEN, J., 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light and hormonal signaling. Science. 3000: 332-336.
- MOORE, P. H. & BUREN, L. L., 1978. Gibberellin studies with sugarcane. I Cultivar differences in growth responses to gibberellic acid. Crop Science. V. 17, p. 443-446
- MOORE, P. H.; PHARIS, R. P. & KOSHIOKA, M., 1986. Gibberellins in apical shoot meristems of flowering and vegetative sugarcane. J. Plant Growth Regul. (5):101-109.

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F., 1962. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497
- NAAR, A.M.; LEMON, B. D. & TJIAN, R., 2001. Transcriptional coactivator complexes. ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY. Vol. 70:475-501
- NAGANO, N.; ORENGO, C.A.; THORNTON, J. M., 2002 . One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. J. Mol. Biol. 321 741-65
- NAGASAKI, H.; SAKAMOTO, T.; SATO, Y. & MATSUOKA, M., 2001. Functional Analysis of the Conserved Domains of a Rice KNOX Homeodomain Protein, OSH15. The Plant Cell, Vol. 13, 2085–2098
- NAKAJIMA, M., et al. 2006. Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. Plant J. 46: 880–889.
- NAMBARA, E. & MARION-POLL, A., 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annu. Rev. Plant Biology. 56, 165-185.
- NELSON, D. R.; Schuler MA, Paquette SM,Werck-Reichhart D, Bak S. 2004. Comparative genomics of rice and Arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. Plant Physiol. 135:756–72
- NEMHAUSER, J. L.; HONG, F. & CHORY, J., 2006. Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. Cell 126: 467–475.
- NISHITANI, K. & TOMINAGA, R. J., 1992. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyses transfer of a segment of a xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. J. Biol. Chem. 267: 21058-21064.
- OFFEN, W.; MARTINEZ-FLEITES, C.; YANG, M.; KIAT-LIM, E.; DAVIS, B. G.; TARLING, C. A.; FORD, C. M.; BOWLES, D. J. & DAVIES, G. J., 2006. Structure of a

flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. The EMBO Journal (2006) 25, 1396–1405

- OKUDA, H.; KIHARA, T. & IWAGAKI, I., 1996. Effects of paclobutrazol application to soil at the beginning of maturation on sprouting, shoot growth, flowering and carbohidrate contents in roots and leaves of Satsuma mandarine. Journal of Horticultural Science, v.71, p.785-789.
- OZGA, J. & DENNIS, M., 2003. Hormonal interactions in fruit development. J Plant Growth Regul 22:73–81
- PAPINI-TERZI, F. S.; ROCHA, F. R.; VENCIO, R. Z. N.; FELIX, J. M.; BRANCO, D. S.; WACLAWOYSKY, A. J.; Del BEM, L. E. V.; LEMBKE, C. G.; COSTA, M. D. L.; NISHIYAMA jr., M. Y.; VICENTINI, R.; VINCENTZ, M. G. A.; ULIAN, E. C.; MENOSSI, M. & SOUZA, G. M., 2009. Sugarcane genes associated with sucrose content. BMC Genomics, 10:120
- PAPINI-TERZI, F. S.; ROCHA, F. R.; VÊNCIO, R. Z.; OLIVEIRA, K. C.; FELIZ, J.de M., VICENTINI, R.; ROCHA, C. de S.; SIMÕES, A. C.; ULIAN, E. C., di MAURO, S. M., da SILVA, A. M.; PEREIRA, C. A.; MENOSSI, M. & SOUZA, G. M., 2005. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. DNA Res. 12:27-38.
- PAPINI-TERZI, F. S.; ROCHA, F. R.; VÊNCIO, R. Z.; FELIZ, J.de M., BRANCO, D. S;
 WACLAWOWSKY, J. A.; DEL BEM, L. E. V.; LEMBKE, C. G.; COSTA, M. D. L.;
 NIHIYAMA, M. Y.; VICENTINI, R.; VINCENTZ, M. G. A.; ULIAN, E. C.; MENOSSI,
 M. & SOUZA, G. M., 2009. Sugarcane genes associated with sucrose content. BMC Genomics 2009, 10:120
- PASIAN & BENNETT,2005. Paclobutrazol-Soaked Ornamental Kale Seeds Produce Short Seedlings
- PATRICK, J.W., 1976. Hormone-directed transport of metabolites. In IF Wardlaw, JB Passioura eds, Transport and Transfer Processes in Plants. Academic Press, New York, pp 433-446

- PATRICK, J.W., 1997. Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Bio 48:191–222
- PEARY, J.. & PRINCE, T. A., 1990. Floral lipoxygenase: activity during senescence and inhibition by phenidone. J Am Soc Hortic Sci 115(3):455–457
- PENG, YB, LU, Y. F; ZHANG, D. P., 2003. Abscisic acid activates ATPase in developing apple fruit especially in fruit phloem cells. Plant Cell Environ 26:1329–1342
- PETERSON, F. C.; LYTLE, B. L.; SAMPATH, S.; VINAROV, D.; TYLER, E.; SHAHAN, M.; MARKLEY, J. L. & VOLKMAN, B. F., 2005.Solution structure of thioredoxin h1 from Arabidopsis thaliana. Protein Science, 14:2195–2200.
- PHILLIPS, A. L.; WARD, D. A., UKNES, S.; APPLEFORD, N. E. J.; LANGE, T.; HUTTLY, A. K.; GASKIN, P.; GRAEBE, J. E.& HEDDEN, P., 1995. Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from Arabidopsis. Plant Physiol. 108: 1049–1057.
- PHILLIPS, I. D. J., 1975. Apical dominance. Annu Rev Plant Physiol 26: 341-367
- PILON-SMITS, E. A. H.; TERRY, N.; SEARS, T.; KIM, H.; ZAYED, A.; HWANG, S.; VAN DUN, K.; VOOGD, E.; VERWOERD, T. C.; KRUTWAGEN RWHH, et al, 1998. Trehaloseproducing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. J Plant Physiol 152: 525–532
- PILS, B. & SCHULTZ, J., 2004. Evolution of the Multifunctional Protein Tyrosine Phosphatase Family. Mol. Biol. Evol. 21(4):625–631.
- PINHEIRO, H. A.; DaMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; LOUREIRO, M. E. & DUCATTI, C., 2005. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of Coffee canephora. Annals of Botany. 96, 101-108.
- POLGE, C. & THOMAS, M., 2007. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control?, Trends Plant Sci. 12, pp. 20–28. Article | PDF (1035 K) | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (29)

- PUIATTI, M.; GONDIM, A.R.O.; PEREIRA, F.H.F.; GROSSI, J.A.S.; COURA, F.A.F. Efeito de doses de N e de paclobutrazol sobre a produção de bulbos e a perda de massa no armazenamento de alho Amarante. Horticultura Brasileira, Fortaleza, v.23, n.1, 2005 (Suplemento).
- RADEMACHER, W., 1997. Bioreulation of crop plants with inhibitors of gibberellin biosynthesis. Proc Plant Growth Regul Soc Am 24:27–31
- RANWALA, A. P.& MILLER, W. B., 2008. Gibberellin-mediated changes in carbohydrate metabolism during flower stalk elongation in tulips. Plant Growth Regul, 2008. 55:241– 248
- REBERS, M, ROMEIJIN G, KNEGT E, VAN DER PLAS LHW., 1994. Effects of exogenous gibberellins and paclobutrazol on floral stalk growth of tulip sprouts isolated from cooled and non-cooled tulip bulbs. Physiol Plant 92:661–667
- RESENDE, G.M.; SOUZA, R.J., 2002. Efeito de doses de Paclobutrazol na cultura do alho. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 37, n. 5, p. 637-641.
- RICHARDS, D. E., KING, K. E., AIT-ALI, T. & HARBERD, N.P. 2001. How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signalling. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52, 67–88.
- RICHMOND, T. A.; SOMERVILLE, C. R., 2000. The cellulose synthase superfamily. Plant Physiol, 124:495-498. A description of the family of cellulose synthase and cellulose synthase-like genes in Arabidopsis and some thoughts on the function of these genes.
- RICHMOND, T., 2000. Protein family review: Higher plant cellulose synthases. Genome Biology 1(4): 3001.1-3001.6
- ROCHA, F. R.; PAPINI-TERZI, F.; NISHIYAMA, M. Y.; VÊNCIO, R. Z. N.; VICENTINI,
 R.; DUARTE, R. D. C.; ROSA, V. E. de; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A. H.;
 RODRIGUES, F. A.; ULIAN, E. C.; ZINGARETTI, S. M.; GALBIATTI, J. A.;
 ALMEIDA, R. S.; FIGUEIRA, A. V. O.; HEMERLY, A. S.; SILVA-FILHO, M. C.;

MENOSSIN, M. & SOUZA, G. M., 2007. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. BMC Genomics, 8:71.

- ROITSCH, T, GONZALEZ MC., 2004. Function and regulation of plant invertase: sweet sensations. Trends Plant Sci 9:606–613
- ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E. & SHEEN, J., 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms, Annu. Rev. Plant Biol. 57, pp. 675–709. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (202)
- ROOKES, J. E. & CAHILL, D. M., 2003. A PAL1 gene promoter-green fluorescent protein reporter system to analyse defence responses in live cells of Arabidopsis thaliana. Europa J of Plant Phys. 113: 175-179 An in silico assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in Arabidopsis thaliana and limitations thereof. Phytochemistry. 64:1097-112.
- SALMON, J.; RAMOS, J.; CALLIS, J. 2007. Degradation of the auxin response factor ARF1. Plant J. 54:118-28.
- SANTOS, C. H.; KLAR, A.E.; GRASSI FILHO, H.,;RODRIGUES, J.D.; PIERRE, F.C., 2004. Indução do florescimento e crescimento de tangerineira poncã (Citrus reticulata Blanco) em função da irrigação e da aplicação de paclobutrazol. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 8-12.
- SASAKI, A.; ITOH, H.; GOMI, K., UEGUCHI-TANAKA, M.; ISHIYAMA, K.; KOBAYASHI, M.; JEONG, D.H.; AN, G.; KITANO, J.; ASHIKARI, M. & MATSUOKA, M. 2003. Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. Science 299: 1896–1898.
- SAZE, H.; UENO, Y.; HISABORI, T.; HAYASHI, H.; IZUI, K., 2001. Plant Cell Physiol. 42, 1295–1302.
- SCHENA, M.; HELLER, R. A.; THERIAULT, T. P.; KONRAD, K.; LACHENMEIER, E. & DAVIES, R. W., 1998. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. Trends in Biotechnology 16:301-306

- SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIES, R. W. & BROWN, P. O., 1995. Quantitaive monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 270:467-470
- SCHONTAL, A. H., 1998. Role of PP2A in intracellular signal transduction pathways. Front Biosci 3: D1262–D1273
- SCHULER, G., 1997. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. Journal Molecular Medicine 75: 694-698
- SCHÜNMANN, P. H. D., SMITH, R. C.; LANG, V., MATTHEWS, P. R., CHANDLER, P.
 M., 1997. Expression of XET-related genes and its relation to elongation in leaves of barley (Hordeum vulgare L.). Plant, Cell and Environment 20, 1439–1450.[CrossRef]
- SCHWEIGHOFER, A.; KAZANAVICIUTE, A. V.; SCHEIKL, A. E.; TEIGE, A. M.;
 DOCZI, A. R.; HIRT, A. H.; SCHWANNINGER, A. M.; KANT, B. M.; SCHUURINK,
 C. R.; MAUCH, C. F.; BUCHALA, D. A.; CARDINALE, D. F., & MESKIENE. I., 2007.
 The PP2C-Type Phosphatase AP2C1, Which Negatively Regulates MPK4 and MPK6,
 Modulates Innate Immunity, Jasmonic Acid, and Ethylene Levels in Arabidopsis. The
 Plant Cell, Vol. 19: 2213–2224.
- SEITZ, B.; KLOS, C.; WURM, M.; TENHAKEN, R., 2000. Matrix polysaccharide precursors in Arabidopsis cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns, Plant J. 21 537–546.
- SICKER, D.; FREY, M.; SCHULZM; GIERL, A., 2000. Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. Int Rev Cytol 198: 319–346
- SILVA, G.J.N; VILLELA, A.L.G., 2008. Indução floral da mangueira e princípios do controle fitossanitário.Disponível em: http://www.nutricaodeplantas.agr.br/site/ensino/pos//Palestras_William/Livromanga_pdf/10_%20manejo_inducao.pdf>.
- SILVA, K. S., 2008. Uso de paclobutrazol em tomateiro cultivadas em 2 ambientes. Tese de Doutorado. Ilha Solteira, 79 p.

- SONBOL, F. M.; FORNALE, S.; CAPELLADES, M.; ENCINA, A.; TOURINO, S.;
 TORRES, J. L.; ROVIRA, P.; RUEL, K.; PUIGDOMENECH, P.; RIGAU, J.;
 CAPARROS-RUIZ, D., 2009. The maize ZmMYB42 represses the phenylpropanoid pathway and affects the cell wall structure, composition and degradability in Arabidopsis thaliana Source: PLANT MOLECULAR BIOLOGY Volume: 70 Issue: 3 Pages: 283-296
- SONNEWALD, U.; HAJIREZAEI, M. R.; KOSSMANN, J.; HEYER, A.; TRETHEWEY, R.
 N. & WILLMITZER, L., 1997. Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. Nat. Bio. 15: 794-797.
- SOUER, E.; VAN HOUWELINGEN, A.; KLOOS, D.; MOL, J. AND KOES, R., 1996. The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. Cell 85, 159-170.
- SOUZA, G. M.; SIMÕES, A. C. Q.; OLIVEIRA, K. C.; GARAY, H. M.; FIORINI, L. C.; GOMES, F. D.; NISHIYAMA-JUNIOR, M. Y. & da SILVA, A.M., 2001. The sugarcane signal transduction (SUCAST) catalogue: prospecting signal transduction in sugarcane. Genet Mol Biol. 24:25-34.
- STANCATO, G. C.; MAZZAFERA, P. & BUCKERIDGE, M. S., 2001. Effect of a drought period on the mobilisation of non-strutural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in na epiphytic orchid. Plant Physiol Bioch (Paris). 39(11):1009-1016.
- STURM, A & TANG, G., 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. Trends Plant Sci 4:401–407
- STURM, A. & TANG, G. Q., 1999. Antisense repression of sucrose synthase in carrot (Daucus carota L.) affects growth rather than sucrose partitioning. Plant Mol. Biol. 41: 465-479.
- STURM, A. & TANG, G. Q., 1999. Antisense repression of sucrose synthase in carrot (Daucus carota L.) affects growth rather than sucrose partitioning. Plant Mol. Biol. 41: 465-479.

- SUN, T. P. & GUBLER, F., 2004. Molecular mechanism of gibberellins signaling in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 55: 197–223.
- SUN, T.P. & KAMIYA, Y., 1994. The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase entkaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. Plant Cell 6: 1509–1518.
- Sun TP, Kamiya Y. 1997. Regulation and cellular localization of ent-kaurene synthesis. Physiol. Plant. 101:701–8
- TAIZ, L. & ZEIGER, E., 2004. Fisiologia Vegetal. 3 ed., Porto Alegre: Artmed Editora.719p.
- TALBOTT, L. D. & RAY, P. M., 1992. Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides: Effects of auxin and turgor. Plant Physiol. 98: 369-379.
- TANIGUCHI, H.; NAKAMURA, T.; MIZUKAMI, H.; KAWANO, S.; SANO, H. &
 KATSUMI, M., 2001. Identity of Cypripedium calceolus (Orchidaceae) in Rebun Island:
 Comparative DNA analysis of related species. Genes & Genetic Systems 76:181-188
- TANIMOTO, E., 2005. Regulation of Root Growth by Plant Hormones—Roles for Auxin and Gibberellin. critical Reviews in Plant Sciences, 24:249–265
- THEVELEIN, J. M.; HOHMANN, S., 1995. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? Trends Biochem Sci 20: 3–10
- THOMAS, S. G.& SUN, T.P., 2006. Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. Plant Physiol. 135: 668–676.
- TOVAR-MENDEZ, A.; MUJICA-JIMENEZ, C.; MUNOZ-CLARES, R. A., 2000. Plant Physiol. 123, 149–160.
- UEGUCHI-TANAKA, M.; NAKAJIMA, M.; MOTOYUKI, A. & MASTSUOKA, M., 2007. Gibberellin Receptor and Its Role in Gibberellin Signaling in Plants. Annu. Rev. Plant Biol. 2007. 58:183–98

- UOZU, S.; TANAKA-UEGUCHI, M.; KITANO, H.; HATTORI, K. & MATSUOKA, M., 2000. Characterization of XET-related genes of rice. Plant Physiol. 122: 853-859.
- VAN DIJKEN, A. J.; SCHLUEPMANN, H.; SMEEKENS, S. C., 2004. Arabidopsi strehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. Plant Physiol 135: 969–977
- VANDESOMPELE, J.; De PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N. & De PAEPE, A., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. (London). 3:research0034.1-0034.11
- VERDOUC, Q., L.; MORINIERE, J.; BEVAN, D. R.; ESEN, A.; VASELLA, A.; HENRISSAT, B.; CZJZEK, M., 2004. Structural determinants of substrate specificity in family 1 b-glucosidases: novel insights from the crystal structure of sorghum dhurrinase-1, a plant b-glucosidase with strict specificity, in complex with its natural substrate. J Biol Chem 279: 31796–31803
- VETTORE, A. L.; da SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.& ARRUDA, P., 2001. The libraries that made SUCEST. Genet Mol Biol. 24:1-7.
- WANG, S. Y.; STEFFENS, G. L.; FAUST, M., 1986. Effect of paclobutrazol on cell wall polysaccharide composition of apple tree. Phytochemistry 25: In press
- WARREN, A.J., 2002. Eukaryotic transcription factors. CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY Vol.12(1):107-114
- WEBER, H.; BORISJUK, L.; HEIM, U.; BUCHNER, P. & WOBUS, U., 1995. Seed coatassociated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. Plant Cell 7: 1835-1846.
- WEIG, A.; DESWARTE, C.; CHRISPEELS, M. J., 1997. The major intrinsic protein family of Arabidopsis has 23 members that form three distinct groupsw ith functional aquaporins in each group. Plant Physiol 124:1347-1357.

- WHITE, C. N.; PROEBSTING, W. M.; HEDDEN, P.& RIVIN, C. J., 2000. Gibberellin and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/absicic acid balance governs germination versus maturation pathways. Plant Physiology, Rockville, v. 122, p. 1081-1088.
- WHITE, J. A.; TODD, J.; NEWMAN, T.; FOCKS, N.; GIRKE, T.; De ILARDUVA, O. M.; JAWORSKI, J. G; OHLROGGE, J.B. & BENNING, C., 2000. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. Plant Physiology 124: 1582-1594
- WHITTAKER, A. & BOTHA , F. C. 1999. Pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1phospho-transferase activity patterns in relation to sucrose storage across sugarcane varieties. Physiol. Plant. 107: 379-386
- WIEDHASE, R. A.; KRAMELL, H. M.; LEHMAN, J.; LIEBISCH, H.W.; LERBS, W.; PARTHIER, B., 1987. Methyl jasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. Plant Sci 51: 177-186.
- WIEMKEN, A., 1990. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. Antonie Van Leeuwenhoek 58: 209–217
- WILLIGE, B. C.; GHOSH, S.; NILL, C.; ZOURELIDOU, M.; DOHMANN, E. M. N.; MAIER, A. & SCHWECHHEIMER, C., 2007. The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. Plant Cell 19: 1209–1220.
- WINTER, H. & HUBER, S. C., 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. Crit. Rev. Plant Sci. 19: 31-67.
- WITT, H. J., 1992. UDP-glucose metabolism during differentiation and dedifferentiation of Riella helicophylla, J. Plant Physiol. 140, 276–281.
- WOOD, A, & PLEG, L. G., 1974. Alteration of liposomal membrane fluidity by gibberellic acid. Aust J Plant Physiol 1(1):31–40

- WOODWARD, A.W.; BARTEL, B., 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. Ann Bot (Lond). 95:707-35.
- WRAY, G. A.; HAHN, M. W.; ABOUHEIF, E.; et al., 2003. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION Vol. 20(9):1377-1419
- WU et al., 2005. DNA Research 12, 9-26
- WU, Y, THORNE, E. T.; SHARP, R. E. & COSGROVE, D. J., 2001B. Modification of Expansin Transcript Levels in the Maize Primary Root at Low Water Potentials. Plant Physiology, Vol. 126, pp. 1471–1479
- WU, Y., SHARP, R. E.; DURACHKO, D. M.; COSGROVE, D. J., 1996. Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cellwall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. Plant Physiol 111: 765–772
- WU, Y.; MAEHARA, T.; SHIMOKAWA, T.; YAMAMOTO, S.; HARADA, C.;
 TAKAZAKI, Y.; ONO, N.; MUKAI, Y.; KOIKE, K.; YAZAKI, J.; FUJI, F.;
 SHOMURA, A.; ANDO, T.; KONO, I.; WAKI, K.; YAMAMOTO, K., YANO, M.;
 MATSUMOTO, T. & Sasaki T., 2002. Plant Cell 14: 525-535
- WU. Y.; MEELY, R. B.; COSGROVE, D. J., 2001a. Analysis of alpha-expansin and betaexpansin gene expression in maize. Plant Physiol 126: 222–232
- XIE, Q.; FRUGIS, G.; COLGAN, D. & CHUA, N. H., 2000. Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. Genes and Development 14, 3024-3036.
- XIE, Q.; SANZ-BURGOS, A. P.; GUO, H. S.; GARCIA, J. A. & GUTIERREZ, C., 1999. GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. Plant Molecular Biology 39, 647-656.

- XU, W.; CAMPBELL, P.; VARGHEESE, A. K.; BRAAM, J., 1996. The Arabidopsis XETrelated gene family: environmental and hormonal regulation of expression. The Plant Journal 9, 879–889
- XU, Y. L.; LI, L.; WU, K.; PEETERS, A. J. M.; GAGE, D. A. & ZEEVAART, J. A. D., 1995.
 The GA5 locus of Arabidopsis thaliana encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase:
 Molecular cloning and functional expression. Proc. Natl. Acad. Sci 92: 6640–6644.
- YABUTA, T. & SUMIKI, Y., 1938. On the crystal of gibberellin, a substance to promote plant growth. J Agric Chem Soc Japan. 14. 1526.
- YAMADA, S.; KOMORI, T.; HASHIMOTO, A.; KUWATA, S.; IMASEKI, H; KUBO, T., 2000. Differential expression of plastidic aldolase genes in nicotiana plants under salt stress. Plant Sci 154:61–69.
- YAMAGUCHI, S., 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. Annu. Rev. Plant Biol. 2008. 59:225–51.
- YANG, J.; ZHANG, J.; WANG, Z.; ZHU, Q. & LIU, L., 2004. Activities of fructan- and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. Planta 220: 331-343.
- YANG, S. F., & HOFFMAN, N. E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 35, 155-189.
- YANG, T.; DAVIES, P. J.& REID, J. B., 1996. Genetic dissection of the relative roles of auxin and gibberellins in the regulation of stem elongation in intact light-grown peas. Plant Physiology, Rockville, v. 110, p. 1029-1034.
- YIM, K. O.; KWON, Y. W. & BAYER, D. E., 1997. Grown responses and allocation of assimilates of rice seedlings by paclobutrazol and gibberellins treatment. J. Plant Growth Regul. 16:35-41.
- YOKOYAMA, R. & NISHITANI, K., 2001. A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-

regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of Arabidopsis. Plant Cell Physiol. 42(10):1025-1033.

- YOUNG, J. C.; BARRAL, J. M. & ULRICH HARTL, F., 2003. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. Trends Biochem. Sci. 28, 541–547.
- ZAGROBELNY, M.; BAK, S.; RASMUSSEN, A. V.; JORGENSEN, B.; NAUMANN, C.
 M.; MOLLER, B. L., 2004. Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. Phytochemistry 65: 293–306
- ZENTELLA, R.; ZHANG, Z-L.; PARK, M.; THOMAS, S. G.; ENDO, A.; MURASE, K.; FLEET, C. M.; JIKUMARU, Y.; NAMBARA, E.; KAMIYA, Y. & SUN, T-P., 2007. Global Analysis of DELLA Direct Targets in Early Gibberellin Signaling in Arabidopsis. The Plant Cell, Vol. 19: 3037–3057.
- ZHANG, C.; KENJI, T.; TAMURA, F.; ITAI, A. & YOSHIDA, M., 2007b. Roles of gibberellins in increasing sink demand in Japanese pear fruit during rapid fruit growth. Plant Growth Regul 52:161–172
- ZHANG, C.; TANABE, K.; TAMURA F, MATSUMOTO K, YOSHIDA A., 2005c. 13Cphotosynthate accumulation in Japanese pear fruit during the period of rapid fruit growth is limited by the sink strength of fruit rather than by the transport capacity of the pedicel. J Exp Bot 56:2713–2719
- ZHANG, D.; LU, Y; WANG Y, DUAN C, YAN H., 2001. Acid invertase is prominently localized to cell walls of both the practically symplasmically isolated sieve element/companion cell complex and parenchyma cells in developing apple fruits. Plant Cell Environ 24:691–702
- ZHANG, L., PENG, Y; PELLESCHI-TRAVIER S, FAN Y, LU Y, LU Y, GAO X, SHEN Y, DELROT S, ZHANG D., 2004. Evidence for apoplasmic phloem unloading in developing apple fruit. Plant Physiol 135:574–586

- ZHANG, X.; LIN, C.; CHEN, H.; WANG, H.; QU, Z.; ZHANG, H.; YAO, J.; SHEN, D., 2003. Cloning of a NaCl-induced fructose-1,6-diphosphate aldolase cDNA from Dualiella salina and its expression in tobacco. Sci China Series C Life Sci 1:49–57
- ZHENG, X.; CHEN, B. ; LU, G. ; HAN, B., 2009. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS Volume: 379 Issue: 4 Pages: 985-989
- ZHU, Y. J.; ALBERT, H. & MOORE, P., 1996. Correlation of sucrose metabolism enzymes with sucrose storage in stem internodes of sugarcane. PLANT PHYSIOLOGY Vol.111(2):378-378 Supplement: Suppl. S

8. ANEXOS

ANEXO 1: Lista dos normalizadores (housekeeping) investigados, com seus respectivos SAS, símbolos e sequências dos primers encontrados no banco do SUCAST.

SAS	Símbolo	Primer Foward	Primer Reverse
SCBGLR1002D06.g	UBE2	5 ' - C A G G T C C T G C T G G T G A G G A T	3'5'- CACCTCCAGCATATGGACTATCAG
SCQGAM2027G09.g	GAPDH	5 ' - C A C G G C C A C T G G A A G C A	3'5'-TCCTCAGGGTTCCTGATGCC
SCCCLR1048F12.g	UB	5 ' - G G T G G C C G G C T T G G A	3'5'- TTTGTTTCGGTTTCAAGTCGATAA
SCJFRZ2009G01.g	60S	5 ' - G C G A G T G C C T C A C C T T T G A C	3'5'-TCTTAGGTCCCCTCAGCAGAAC
SCEZRZ1013H01.g	eEF 1α	5'-GACTGTGCCGTCCTTATCATTG	3'5'-ACGGGTCTGGCCATCCTT
SCCCCL3080A11.g	UBQ10	5 ' - C G T C C G C A G T C C C C A A T	3'5'-TGAGAGGATCGCGAGGATTC
SCRFLR1012H05.g	Act 11	5 ' - C T G A C G C C G A G G A T A T C C	3'5'-CAGCGAACCCAGCCTTGA
SCCCLR1069D05.g	Act	5'-CCAGTTCCATTGTCACAAACAAG	3'5'-TCTCCGGAATCCGTAGCAAA
SCRUSB1062D10.g	25S RNA	5'-ATAACCGCATCAGGTCTCCAAG	3'5'-CCTCAGAGCCAATCCTTTTCC
SCCCLR1C01B02.g	Act 2	5 ' - C C C T G T G C T G C T C A C T G A A G	3'5'-GTCTCGAACATAATCTGGGTCATCT
SCCCST2001G02.g	PUB	5'-CCGGTCCTTTAAACCAACTCAGT	3'5'-CCCTCTGGTGTACCTCCATTTG

182

ANEXO 2: Lista dos primers utilizados, com seus respectivos SAS, encontrados no banco do

SUCAST.

SAS	Primer Foward	Primer Reverse
SCCCRZ2002G07.g	AAAATCAATTGGAGCAAGTTGAGA	AGACTTACCTAGACCGGCTGTCA
SCRULR1020D11.g	TGACACCATGGACCATGCAT	GGCGACTAGCTCGATCTTTTCA
SCRLSB1044E01.g	CGAGCGAAGAATCATGGTAGGT	TGACAGAAGTCGCCGCATTA
SCCCRT1001E01.g	CGTGTCGTTGGCGAAGAAG	CGTCGCCAACTCATGGATCT
SCACLR2007B05.g	AGTTAAAGAAGAGCGTAGCAGCAAT	AAAACAGAGAAGAACTCCCCCATT
SCACLR2007G02.g	TCCGGGCCTCCTGTATGA	GCCGGTGGACATGAATGC
SCAGLR1021F11.g	CCTTCCGCTTCTCCATTGC	CACGCCTTCTTTGTTGATTCC
SCAGLR1021G10.g	CTTGACCTGAAGCAAATCAACAAC	ATCATCAGGTGGTGCATTTCC
SCBFLR1039B05.g	CCTCATCTTCTTCTTCTTCTCG	CGAGTTCAAAGTTCCTTCCCC
SCBFLR1046E10.g	CGGCCGGACAGATTCTTATC	GGGTGCGAGGTGGCTTTTAT
SCBGLR1096E06.g	GATTCGCTCTCCAGGCTCG	GCATGTACTCCGAGACAGCGAC
SCCCAD1003D12.g	CGGCAAGCCGCTTCACT	CAGTTATGTCTCCACCTTGAACCA
SCCCCL5004B03.g	GGAGTGGTCGGTGACCTTGA	CGGCGTGCAGATGTTCCT
SCCCLB1004E10.g	CACTGCTGGCTGATCGATGT	CAGGAATGCACACAGCAAGTTT
SCCCLR1C05B07.g	CAGCCTTGATTGTGGTTTCCA	AGCTTATTGGCGTGTTGTTTAGTTT
SCCCLR2003E10.g	CATCTTCTCCCACTCGTTCTTCTT	AGGGATCGCTCAGCTGGAT
SCCCRT1C06D06.g	ACCGACCCCACAAAGTATGC	GTGCAATGTGGTTGCTGTGAT
SCCCRT2001H11.g	GCAGAAACGGAGCCATGGT	GCCAAATTTCAGCGAAACGA
SCCCRZ1001G10.g	TCCACCAGCTTGCTCTCGTT	TCAGCTCCTTCACCATTGGAA
SCCCRZ1001H05.g	CATCCTGCTGCTTTTACTCCATT	AGGGATCGGAGCACTTTTGTT
SCEPRZ1010E06.g	CGTCTTCTAGCCTCTGGAAACAC	AGACAGCAGAGGTGGACATGAA
SCEPSD1005D08.g	TCCTCGTCGGCGATATGTTT	CATCTAGTGTGCCTTGAGCAGAA
SCEZHR1088E02.g	CAGCTGGTCAAGAAAACCATCA	GATGCATTAGAAGCTTTGAAGGAGAT
SCEPLB1042D02.g	CACTGTGGCTGCAACACCAT	CGAAACGAAGAAAAGGCAGAA
SCQGLR1085G10.g	CCAGGAGAATCTGAGCCTGAA	GTGCGGAGCATCCATGGT
SCRFLR2037F09.g	GCAGCGACCGATACAATACAAC	CGACGCACGATGGAAGCT
SCSBST3096H04.g	TGGGTTTATCTGGGCTGATCTT	ACCGCCCTGTTGCAATGT
SCRULR1020D09.g	CACCATCAACGGGTCAATCC	TCCTCCCCGAACATGAACTC
SCJLLR2020E06.g	CAACACAAGCGTGCAGGAACT	TACTGCAGCCTGGAACAAACA
SCUTLR1058B02.g	CGTGCTGGGTGGAGATGAG	AGGTCACGGTGGAGTACATCAA
SCVPRT2075C09.g	CAGAAGTCGAATAGTCACCGAAAGT	TTGATCGTCTTTTGCCTTATCAGA
SCJFLR1013H10.g	TGCCCTGCTATTGAAGTTTGTG	GCTGATCGCTGTTCCATGCT
SCJFLR1074A11.g	CATCGCCGTGGAGGAGAT	CTAGCAACCGGACCAACACTCT
SCCCRZ1002G01.g	GTCCTCGGCGGAGACGTT	CGTGGTGTCCCCCAGATC
SCRFLR1012F12.g	CGGGTTCAAGGCCACCTA	AGGTGTGCGTATTTACTTGATGAACT
SCCCCL3001A05.g	CTTCAAAGGGACACGATCATGA	TTGAGCTGGACCTTGATGAGGTA
SCCCCL4003E08.g	AACTGGGAAGCTGTCCTTCTCA	ACACAGCATCAGTCTCATTTGAAAA
SCCCHR1003D05.g	CACCAAAGGTCAGTTTATGACAGAA	CCGTAGTTGTCACAGCAAAGCA
SCCCLB1003E11.g	CTCGGCAGGTTCTTCAGGAA	TTCGTTGCCGATCCTTCAA
SCCCST1004A07.g	CGTCGCCGTCAAGCTCAT	TTGACGATCTCGCGATACACA
SCCCST1006B11.g	GCAAGATGGCGGATGTTTG	AAAAGGGTACGCACCAACCA
SCEPRZ1009C10.g	TCAGAGCAAACAACCGAAGAAAT	GCCATAGCCTGATCTCAATGATT
SCEQLB2019B08.g	TTTCCACGCAGGACAGTGAA	GAACGGAATGGAATGAATGTCA

SAS	Primer Fewerd	Primer Deverse
SCREL R 103/1006 g		
SCREER1034000.g		
SCEOPT2027H03 g	CTCAACTTCCCCACCAACCT	
SCIEP72032C01 g	CCCTAATTCCTCAAACCATTCC	
SCJFRZ2052001.g		
SCS0515121C00.g		
SCSDIK1030D11.g		
SCEZHP1047C06 g		
SCE20071024E12 a	GGCAGIICGAIIGCCGAIAA	
SCEQRI1024E12.g		
SCEQK11026600.g		
SCBFLR1040C09.g		
SCSFLR2009F02.g		
SCSFR12068D12.g		
SCJLRT1016G06.g		
SCQGLR1085F11.g		
SCEZLB100/F08.g	ATTGCCGTAGGGTTCTCGTATC	
SCJLHR1028C12.g	AACTGGTTGATTTGTCATGTTGTGT	
SCQGLV1016A04.g	GCCCTACCAGCGTGTGCTG	
SCBGLR1002D06.g	CAGGTCCTGCTGGTGAGGAT	CACCTCCAGCATATGGACTATCAG
SCCCLR10/2A03.g	GGGCAGAAGGTGTTTGATATGTC	ATCCAAAAGGCTGTTAGAATTCAAG
SCJFRZ2009G01.g	GCGAGTGCCTCACCTTTGAC	TCTTAGGTCCCCTCAGCAGAAC
SCCCLR1048F12.g	GGTGGCCGGCTTGGA	TTTGTTTCGGTTTCAAGTCGATAA
SCCCLR1069D05.g	CCAGTTCCATTGTCACAAACAAG	TCTCCGGAATCCGTAGCAAA
SCCCST2001G02.g	CCGGTCCTTTAAACCAACTCAGT	CCCTCTGGTGTACCTCCATTTG
SCEQRT2100B02.g	TCCAGTACATGACGCCCTGTT	CACGTGCTTGACACAACTACTAACG
SCCCLB1001H01.g	AGCGCCGTCCTGTCCAA	TGCCGTCCGCTCCAGTT
SCCCLR1022B11.g	ATGCCATGCTGCGTTTTCTC	TGGGCTTTCTCTGGCAACA
SCJLLR1054F03.g	GCTGCACGGACGGCTTT	TGTCCCACCGGTCTCATGT
SCJLLR1033E07.g	GGTCCTGCGGCAACCA	CCTGCACCGAATCTTGTAGCA
SCACSB1117F03.g	AACACTGAGCACAAGTGAGAATGG	GAATGTGTCACGCACAGTACTTCTT
SCCCLR1001A05.g	CCAAAGTGCTTGGAAACGAAGT	TCGCTGCAATTCGCATTG
SCEZAM1080E11.g	CGGTAATGACGAAAGGTCCAA	AGCGGGTGCCGTGGTA
SCCCLR2C02A05.g	GGCAGCTGACGGAATAGCAA	AAAGAGCACCGGCAATGG
SCQGRT1040G03.g	AGCTACGTTTTGTGCAGTTTCAAG	CCCATACTGCTCGGGTTTGT
SCAGLR1064F05.g	GCCATATGCGGCGAGATC	CAACCTTCCTGTGCAACCAA
SCBGLR1002A01.g	GGTCGTCGACACAAACTTCAAC	GAGAGCAGATCGGTACAACTATAAGTCA
SCMCCL6053A05.g	GTGATGGTGACCAGCGTTTG	CAGCAAGCCTCGCCTCAA
SCSFRT2070A10.g	GTCTCCTTGCGCACGTTGA	GATGACCCGGCCAGGAA
SCCCRZ2003D01.g	TCTGCTGCGAACTGGAGTATTTAC	TTTTTTCCGTTCTCTTTGTTGTTTC
SCVPFL3044C07.g	GCTCATTTGCCTCCCTATCAGTA	TGGATTGGTGGGCAGAGAA
SCEQLR1050D04.g	GATTGAAGCAACGGGAACTGA	GGATCGGCCTGTGTTCGT
SCBFAD1046D01.g	CGCGCCCATCCGAAA	TCTTGACACTCTCGTTGCCAAT
SCBGLR1002A09.g	AGTACCCGTCGTACGAGATCGA	GTCGGAAAGAGCCAAGAAGAAC
SCCCLR1024C03.g	GCGTTTGGTTGGCTGGTT	CCTGGCTCACTAGGGAATCTTG

ANEXO 3: Alinhamento das sequencias de alguns aminácidos feitas no programa CLUSTAL W. De acordo com a literatura citada no M & M, alguns normalizadores foram selecionados e blastados contra o banco de dados SUCAST (cana-de-açúcar), e foram encontrados diversos EST com e-value = 0, posteriormente foi feito o alinhamento para a confirmação de homologia, seleção da região para confecção dos primers.

>gi 115454970 ref NM (Os03g0718100) mRN Resultado do Blast em SCRFLR1012H05.g SCBFLR1039B12.g SCCCLR1069D05.g SCCCCR71001E09.g SCCCLR1001B02.g SCQSLR1018C05.g SCCCLR1076G12.	$\begin{array}{c} 1_001057621.1 \text{ Oryza sativa (japonica cultivar-Group) Os03g0'} \\ \text{NA, complete cds (ACT 11)} \\ \text{n cana com e-value=0} \\ & \frac{1709 0.0}{848 0.0} \\ & \frac{821}{747} 0.0 \\ & \frac{747}{700} 0.0 \\ & \frac{676}{74} 0.0 \end{array}$	718100
SCCCRZ1001E09.g SCCCLR1C01B02.g _ACT SCRFLR1012H05.g	AGTGGGCGTACTACTGGTATTGTTCTCGACTCTGGTGATGGTGTGAGCCACACTGTGCCC AGTGGGCGTACTACTGGTATTGTTCTTGACTCTGGTGATGGTGTGAGCCACACTGTGCCC AGTGGTCGTACCACAGGTATTGTGTTGGACTCTGGTGATGGTGTCAGCCACACTGTCCCC AGTGGCCGTACCACAGGTATCGTGCTCGACTCGGGAGATGGTGTCAGCCACACTGTCCCC ***** ***** ** ***** ** * ***** ** *****	656 652 603 596
SCCCRZ1001E09.g SCCCLR1C01B02.g _ACT SCRFLR1012H05.g	ATTTACGAAGGATATGCCCTTCCCCATGCCATTCTTCGTTTGGATCTTGCTGGCCGTGAC ATTTACGAAGGATATGCCCTTCCTCATGCCATTCTTCGTTTGGATCTTGCTGGTCGGGAC ATCTATGAAGGATATGCTCTCCCCCATGCTATCCTTCGTCTCGACCTTGCTGGGCGTGAT ATCTACGAGGGATACGCCCTCCCCCCACGCCATTCTTCGTCTCGACCTGGCCGGCC	716 712 663 656
SCCCRZ1001E09.g SCCCLR1C01B02.g _ACT SCRFLR1012H05.g	CTCACGGACTCCCTCATGAAAATTCTGACCGAGAGGGGTTACTCCTTCACGACCTCTGCT CTCACAGACTCCCTCATGAAAATTCTCACTGAGAGGGGTTACTCCTTCACAACCTCTGCT CTCACTGATTACCTCATGAAGATCCTGACGGAGCGTGGTTACTCATTCACCACAACGGCC CTCACCGACTACCTCATGAAGATCCTGACTGACGGAGCGGCTACTCCTTCACAACCACTGCT ***** ** * ******** ** ** ** ** ** ** *	776 772 723 716
SCCCRZ1001E09.g SCCCLR1C01B02.g _ACT SCRFLR1012H05.g	GAGCGAGAAATTGTAAGGGACATCAAGGAGAAGCTTGCATATATAGCTCTTGACTATGAG GAGCGGGAAATTGTAAGGGACATCAAGGAGAAGCTGGCATATATAGCCCTTGACTATGAG GAGCGGGAAATTGTGAGGGACATGAAGGAGAAGCTTTCCTACATCGCCCTGGACTATGAC GAGCGGGAAATTGTCAGGGACATGAAGGAGAAGCTCGCCTACATTGCCCTGGACTACGAC ***** ******* ******* ***************	836 832 783 776
SCCCRZ1001E09.g SCCCLR1C01B02.g _ACT SCRFLR1012H05.g	CAAGAGTTGGAAACTGCCAAGAACAGCTCCTCAGTTGAAAAGAGCTATGAGCTACCTGAT CAAGAGTTGGAAACTGCCAAGAACAGCTCCTCAGTTGAAAAGAGCTATGAGCTACCTGAT CAGGAAATGGAGACTGCCAAGACCAGCTCCTCCGTGGAGAAGAGCTACGAGCTTCCTGAT CAGGAGATGGAGACTGCCAAGACCAGCTCTTCCGTGGAGAAGAGCTACGAGCTTCCTGAT ** ** **** ****	896 892 843 836
SCCCRZ1001E09.g SCCCLR1C01B02.g _ACT SCRFLR1012H05.g	GGTCAAGTAATCACCATTGGTGCAGAGAGGGTTCAGGTGCCCTGAGGTCCTCTTCCAGCCA GGTCAAGTAATCACCATTGGTGCAGAGAGAGTTCAGGTGCCCTGAGGTCCTCTTCCAGCCG GGACAGGTTATCACCATTGGTGCTGAGCGTTTCCGCTGCCCTGAGGTCCTCTTCCAGCCT GGACAGGTCATCACCATTGGCGCTGAGCGCTTCCGCTGCCCTGAGGTCCTCTTCCAGCCA	956 952 903 896

ANEXO 4: Alinhamento das sequencias de alguns aminácidos feitas no programa CLUSTAL W. De acordo com a literatura citada no M & M, alguns normalizadores foram selecionados e blastados contra o banco de dados SUCAST (cana-de-açúcar), e foram encontrados diversos EST com e-value = 0, posteriormente foi feito o alinhamento para a confirmação de homologia, seleção da região para confecção dos primers.

>gi 115451090 ref NM_0	001055681.1 Oryza sativa (japonica cultivar-group) Os03g0177500 (Os0	3g0177500)	mRNA,
complete cds (eEF 1 al	fa)		
Resultado do blast em ca	na com e-value = 0		
SCJLRT1006G01.g	1853 0.0		
SCEZRZ1013H01.g	1814 0.0		
SCEQLR1007G03.g	1764 0.0		
SCCCCL3004F01.b	1741 0.0		
SCCCLR1022B09.g	<u>1386</u> 0.0		
SCVPLB1020E07.g	922 0.0		
SCCCLB1021F05.g	795 0.0		
SCJFAD1012C08.g	743 0.0		
50011121012000.g	<u></u> 010		
SCCCLB1021E05 a	CANGETATECETECTCEACANECTCANECCTEACCAEACACACETATCACCATTEA	308	
SCVPLB1020E07.g	CARGINIGCOIGGOIGCICGACARGCICARGGCIGAGGGGGGGGGGGGGGGGGG	315	
SCEZRZ1013H01.g	CAAGTACGCGTGGGTGCTCGACAAGCTCAAGGCTGAGGGGGGGG	314	
SCJLRT1006G01.g	CAAGTACGCGTGGGTGCTTGACAAGCTCAAGGCTGAGCGTGAGAGAGGGTATCACCATTGA	304	
SCCCCL3004F01.b	CAAGTATGCGTGGGTGCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGAGAGGGTATCACAATTGA	356	
eEF	CAAGTACGCGTGGGTGCTCGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGAGAGGGTATCACCATCGA	318	
-	***** ** ******* **********************		
SCCCLB1021F05.g	TATCGCTCTATGGAAGTTTGAGACCACCAAGTACTACTGCACTGTCATTGATGCCCCTGG	368	
SCVPLB1020E07.g	TATCGCTCTGTGGAAGTTTGAGACCACCAAGTACTACTGCACTGTCATTGATGCCCCTGG	375	
SCEZRZ1013H01.g	TATCGCTCTGTGGAAGTTTGAGACCACCAAGTACTACTGCACTGTCATTGATGCCCCTGG	374	
SCJLRT1006G01.g	TATCGCTCTGTGGAAGTTCGAGACCACCAAGTACTACTGCACTGTCATTGATGCCCCTGG	364	
SCCCCL3004F01.b	TATCGCCCTGTGGAAATTCGAGACCACCAAGTACTACTGCACTGTTATTGATGCCCCTGG	416	
_err	IAIIGUUUIGIGGAAGIIUGAGAUUAUUAAGIAUIAUIGUAUGGIUAIUGAIGUUUUIG	3/8	
SCCCLB1021F05.g	ACACCGTGACTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCAAGCTGACTGTGCCGTCCT	428	
SCVPLB1020E07.g	ACATCGTGACTTCATCAAGAACATGATCACCGGTACCTCCCAGGCTGACTGTGCCGTCCT	435	
SCEZRZ1013H01.g	ACACCGTGACTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCAGGCTGACTGTGCCGTCCT	434	
SCJLRT1006G01.g	ACACCGTGACTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCAGGCTGACTGTGCTGTCCT	424	
SCCCCL3004F01.b	ACACCGTGACTTCATCAAGAATATGATCACTGGCACTTCCCAAGCTGACTGTGCTGTTCT	476	
_eEF	TCACCGTGACTTCATCAAGAACATGATCACGGGTACCTCCCAGGCTGACTGTGCCGTGCT	438	
	** ************************************		
SCCCLB1021F05.g	TATCATTGACTCCACCACTGGTGGTTTTTGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCG	488	
SCVPLBI020E07.g	TATCATTGACTCCACCACCGGIGGIIIIGAGGCIGGIAICICCCAAGGAIGGCCAGACCCG	495	
SCHERT1006C01 a	TATCATTCACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	494	
SCCCCL3004F01 b	TATCATTGATTCCACCACTGGTGGTTTTGAGGCTGGTATCTCCCAGGATGGCCAGACCCG	536	
eFF	CATCATTGACTCCACCACTGGTGGTTTTGAGGCTGGTATCTCCCAAGGATGGCCAGACCCG	498	
	******* *******************************		
SCCCLB1021F05.g	TGAGCATGCCCTCCTTGCTTTCACCCTTGGAGTGAAGCAGATGATTTGCTGCTGCAACAA	548	
SCVPLB1020E07.g	TGAGCATGCCCTCCTTGCTTTCACCCTTGGAGTCAAGCAGATGATTTGCTGCTGCAACAA	555	
SCEZRZ1013H01.g	TGAGCATGCCCTCCTTGCTTTCACCCTTGGAGTGAAGCAGATGATTTGCTGCTGCAACAA	554	
SCJLRT1006G01.g	TGAGCATGCTCTCCTTGCTTTCACCCTTGGAGTGAAGCAGATGATTTGCTGCTGCAACAA	544	
SCCCCL3004F01.b	TGAGCATGCTCTCCTTGCTTTCACACTTGGAGTGAAGCAGATGATTTGCTGCTGCAACAA	596	
_eEF	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGATGATCTGCTGCTGCAACAA	558	

ANEXO 5: Alinhamento das sequencias de alguns aminácidos feitas no programa CLUSTAL W. De acordo com a literatura citada no M & M, alguns normalizadores foram selecionados e blastados contra o banco de dados SUCAST (cana-de-açúcar), e foram encontrados diversos EST com e-value = 0, posteriormente foi feito o alinhamento para a confirmação de homologia, seleção da região para confecção dos primers.

>gi|115444400|ref|NM_001052515.1| Oryza sativa (japonica cultivar-group) Os02g0161900 (Os02g0161900) mRNA, complete cds (UBQ) Resultado do blast em cana com e-value = 0SCCCRZ1002C04.g <u>1380</u> 0.0 1296 0.0 SCCCLR1001C11.g SCCCCL3080A11.g <u>1247</u> 0.0 1223 0.0 SCACLR1057F07.g SCVPRZ2038C12.g 1035 0.0 969 0.0 SCCCLR1C03C10.g 936 0.0 SCBFLR1026D07.g SCCCLR1C03H09.g 848 0.0 <u>839</u> 0.0 SCCCCL3080A11.b 791 0.0 SCCCST2001G02.g SCQSRT2032E09.g 783 0.0 SCCCCL4014E10.g 767 0.0 <u>767</u> 0.0 SCVPRZ3026B09.g SCBFRZ3006E06.g 739 0.0 SCEZAM2059H12.g <u>708</u> 0.0 SCCCST1005F12.g 682 0.0 SCSGFL4118F01.g 668 0.0

<u>656</u> 0.0

SCCCLB1026D12.g

_UBQ SCCCRZ1002C04.g SCCCCL3080A11.g SCCCST1005F12.g SCEZAM2059H12.g SCQSRT2032E09.g SCCCLR1001C11.g	GGCTAAGATCCAAGATAAGGAGGGCATCCCCCCGGACCAGCAGCGGCTCCATCTTCGCTGG GGCTAAGATCCAGGACAAGGAAGGCATTCCTCCGGACCAGCAGAGGCTGATCTTGCTGG GGCTAAGATCCAGGACAAGGAAGGCATTCCTCCGGATCAGCAGAGGCTGATCTTGCTGG GGCTAAGATCCAGGACAAGGAAGGCATCCCCCCGGATCAGCAGAGGCTCATCTTCGCTGG GGCCAAGATTCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCCGGACCAGCAGCGGCTCATCTTTGCCGG GGCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCCGGACCAGCAGCGGCTCATCTTTGCCGG GGCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCCGGACCAGCAGCGGCTCATCTTTGCCGG GGCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCCGGACCAGCAGCGGCTCATCTTTGCCGG	221 211 222 201 126 230 239
UBQ	CAAGCAGCTGGAGGATGGCAGGACCCTTGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCGACCCT	281
SCCCRZ1002C04.g	CAAGCAGCTTGAGGATGGCCGTACCCTAGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCT	271
SCCCCL3080A11.g	CAAGCAGCTCGAGGATGGCCGTACCCTAGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCT	282
SCCCST1005F12.g	CAAGCAGCTTGAGGACGGCCGTACCCTTGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCT	261
SCEZAM2059H12.g	CAAGCAGCTCGAGGACGGGCGCACGCTTGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGAGCACCCT	186
SCQSRT2032E09.g	CAAGCAGCTCGAGGACGGGCGCACGCTTGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGAGCACCCT	290
SCCCLR1001C11.g	CAAGCAGCTCGAGGACGGGCGCACCCTTGCCGACTACAACATCCAGAAGGAGAGCACCCT	299
	******* ***** ** * * ** ** ** *********	
UBQ	TCACCTTGTCCTCCGCCTCCGTGGTGGCATGCAGATCTTTGTCAAGACTCTGACCGGCAA	341
SCCCRZ1002C04.g	CCACCTGGTGCTCAGGCTTAGGGGAGGCATGCAGATCTTTGTCAAGACCCTCACTGGCAA	331
SCCCCL3080A11.g	CCACCTGGTGCTCAGGCTCAGGGGAGGCATGCAGATCTTCGTCAAGACCCTCACTGGCAA	342
SCCCST1005F12.g	CCATCTGGTGCTCAGGCTCAGGGGAGGCATGCAGATCTTCGTCAAGACCCTCACTGGCAA	321
SCEZAM2059H12.g	CCACCTTGTGCTCCGCCTCAGGGGAGGCATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACCGGCAA	246
SCQSRT2032E09.g	CCACCTTGTGCTCCGCCTCAGGGGTGGAATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACTGGCAA	350
SCCCLR1001C11.g	CCACCTTGTGCTCCGCCTCAGGGGTGGAATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACTGGCAA	359
	** ** ** *** * ** * ** ** *************	
_UBQ	GACTATCACCCTTGAGGTGGAGTCTTCTGACACCATCGACAACGTCAAGGCCAAGATCCA	401
SCCCRZ1002C04.g	GACTATCACGCTTGAGGTCGAGTCTTCTGACACGATCGAT	391
SCCCCL3080A11.g	GACTATCACGCTTGAGGTCGAGTCTTCTGACACGATCGACAACGTGAAGGCCAAGATCCA	402
SCCCST1005F12.g	GACCATCACGCTTGAGGTCGAGTCTTCTGACACGATCGACAACGTGAAGGCCAAGATCCA	381
SCEZAM2059H12.g	GACTATCACCCTTGAGGTGGAGTCTTCTGACACCATTGACAACGTCAAGGCCAAGATCCA	306
SCQSRT2032E09.g	GACTATCACCCTTGAGGTGGAGTCCTCGGACACCATCGACAATGTCAAGGCCAAGATCCA	410
SCCCLR1001C11.g	GACTATCACCCTTGAGGTGGAGTCCTCGGACACCATCGACAACGTCAAGGCCAAGATCCA	419

ANEXO 6: Breve descrição das funções e características dos genes que foram estudados.

Auxinas (1 e 3): hormônio que também atua no desenvolvimento apical e sua presença é regulada a das GAs, o gene (3) é um fator de transcrição que pode apresentar relação com duplicação cromossômica SANIEWSKI & MUNK, 1981; OKUBO & UEMOTO, 1985; SANIEWSKI, 1989; WOODWARD & BARTEL, 2005).

Absicic Stress Repining (2): muitos genes que tem relação com ABA estão envolvidos com estresse hídrico, senescência, amadurecimento de frutos (IUSEM et al., 1993; AMITAI-ZEIGERSON et al., 1994; ROSSI & IUSEM, 1994). Esse gene é codificado por uma pequena família multigênica e é caracterizada por possuir proteínas básicas e altamente hidrofílicas, tem altos níveis de His, Glu e Lys. Ela possui duas regiões altamente conservadas, sendo a primeira região tendo um pequeno grupo de 5 a 7 residuos de His (N-terminal) e a outra constitui a maior parte (região C-terminal) correspondendo a aproximadamente 70 aminoácidos. Provavelmente está localizada no núcleo da célula (PADMANABHAN et al., 1997; HONG et al., 2002). Elas estão presentes em um vasto grupo de plantas: di e monocotiledôneas, gramíneas e arvóres (MASKIN et al., 2001). O ASR (Absicic Stress Repining) ainda não tem uma função definida claramente, variando bastante seu efeito entre diferentes espécies vegetais, podendo atuar como um promotor de transporte de monossacarídeos e/ou funcionar como sinalizador de sacarose e/ou glucose (CAKIR et al, 2003).

GAI – GA-insensitive (4): pertence a família das proteínas GRAS (GAI, RGA, SCR), que é uma família exclusiva de vegetais que está envolvida com a via de transdução de sinal das giberelinas (BOLLE, 2004; PYSH et al, 1999; TIAN et al, 2004; FOSTER ET al, 2007). Entre suas funções estão a mediação da sinalização induzida por GA, atividade hidrolítica. GAI pertence a uma subfamília conhecida como DELLA, onde todas as proteínas DELLA contém uma região polimérica de Ser e Thr, que pode conter sítios de fosforilação ou glicosilação, repetições de sete Leu que podem mediar a interação proteína-proteína (SILVERSTONE et al., 2001; GUBLER et al., 2002; ITOH et al., 2002).

Proteínas DELLA são conservadas repressoras da sinalização de GA que atuam imediatamente reprimindo o receptor de GA para modular todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento induzido pelo GA em plantas (THOMAS & SUN, 2004; GRIFFITHS et al., 2006; NAKAJIMA et al.,2006). As proteínas DELLA ajudam a estabelecer a homeostase de GA através de feedback, regulando a expressão de genes de biossintese e receptores de GA, e elas também promovem a repressão de expressão de prováveis proteínas reguladoras que são componentes negativos na sinalização de GA, no entanto na literatura há controvérsia conforme mostrado na disscusão.

Genes reprimidos que codificam uma resposta relacionada a (ao):

Promotor de crescimento e nitrilase (5 e 6): tem relação com a resposta do hormônio auxina, tanto no crescimento apical como na via de biossíntese, respectivamente. Seus efeitos e importância já foram comentados no item **1** e **3**.

Lipoxigenase (7): é uma enzima que participa intensamente no processo de germinação e atua na via de biossíntese do ácido jasmônico, que é um hormônio que atua na degradação da clorofila (WIEDHASE et al., 1987), no mecanismo de defesa principalmente contra estresse mecânico (FARMER & RYAN, 1990, 1992).

Ácido absicísico (8): muitos genes que tem relação com ABA estão envolvidos com estresse hídrico, participando do fechamento estomático, senescência foliar, etc (IUSEM et al., 1993; AMITAI-ZEIGERSON et al., 1994; ROSSI & IUSEM, 1994).

GID1 (9): é um tipo de receptor positivo solúvel de GA, que geralmente se ligam as GA 4 ativas (UEGUCHI-TANAKA et al, 2005). Essas enzimas contém uma sequência consensu de Ser e também apresentam uma sequência conservada de dipeptídeos de His-Gly, que são encontrados na maioria dos domínios amino-terminal das lípases. Essas sequências estão envolvidas com a conformação do site das lípases ativas, e participam desde a substituição de um resíduo conservado de

Ser e/ou His pela Ala e Gln, respectivamente, resultando na perda da atividade da lípase e esterase (FELLER et al, 1991).

GRAS (10): proteínas GRAS (GAI, RGA, SCR) pertencem a uma família exclusiva de vegetais que está envolvida com a via de transdução de sinal das giberelinas. Em *Arabidopsis* existem mais de trinta tipos de proteínas GRAS, onde todas demonstram alta similaridade com o domínio GRAS Cterminal. Já a região N-terminal dessas proteínas parecem ser divergentes de forma geral e estas diferenças parecem estar relacionadas com as diferentes funções nas vias celulares (PYSH et al, 1999). As proteínas GRAS apresentam uma região conservada de aproximadamente 350 aminoácidos que são divididos em cinco motivos: Leu heptad repetição I, VHIID, Leu heptad repetição II, PFYRE e SCR (PYSH et al, 1999; BOLLE, 2004). Os genes de GAI e RGA apresentam alta similaridade com SCR e SCL (SCARECROW-LIKE) (PYSH et al, 1999), logo pertecem a subfamília da proteína DELLA (BOLLE, 2004; PYSH et al, 1999; TIAN et al, 2004; FOSTER ET al, 2007).

SLY 1 (11): Pertence ao grupo das proteínas F-box, e estão envolvidas com a sinalização de GA, se localizam no núcelo e fazem parte do complexo SCF^{SLY1} ubiquitina E3 ligase (McGINNIS et al, 2003; SASAKIi et al, 2003), e interage com as proteínas DELLA (UEGUCHIi-TANAKA et al, 2005; GRIFFITHS et al, 2006; NAKAJIMA et al., 2006, WILLIGE et al., 2007; ZENTELLA et al, 2007). É um mediador positivo da sinalização de GA, pois desencadeia a degradação da proteína DELLA RGA e GAI, no entanto, a interação entre SLY e GAI requer o domínio GRAS de GAI, como oposição ao domínio DELLA N-terminal regulatório (ZENTELLA et al, 2007). Está envolvido com a regulação dagerminação e dormência das sementes, diferenciação e expansão das pétalas, entre outros (DILL et al, 2004).

Xerico (12): XERICO é um provável gene alvo de DELLA, e seus níveis transcritos foram induzidos por DELLA e reprimido por GA. XERICO apresenta tolerância a seca e fenótipo de superexpressão do gene em Arabidopsis (Ko et al., 2006).Esse fenótipo é acompanhado por elevados

níveis de ABA na planta e hipersensibilidade ao sal e ABA durante ao desenvolvimento da plântula (ZENTELLA et al, 2007).

Giberelina 20-oxidase (13 e 14): é uma enzima que participa no processo de síntese das GAs e catalisa todas as reações que envolvem as etapas sucessivas de oxidação do carbono 20 entre GA_{53} e GA_{20} , incluindo a remoção do C-20 como CO₂ (PHILLIPS et al, 1995; XU et al. 1995; HEDDEN & PHILLIPS, 2000).

Fator de transcrição homólogo ao *DRE binding factor 2* (15): são proteinas de elemento de ligação responsivas a desidratação, dehydration-responsive element-binding proteins (DRE), são fatores de transcrição da família AP2 e homólogo a DREB2 (*DRE binding factor 2*). Esta subfamília de genes tem tido uma maior atenção e tem sido muito estudada devido a sua participação em resposta de plantas a estresses bióticos e abióticos (SUN et al, 2008).

ACC oxidase, ACC sintase, 2-oxiglutarato dependente de dioxigenase (16, 17 e 18): são enzimas que participam nas etapas de biossíntese do etileno (YANG & HOFFMAN, 1984).

Com base nas similaridades entre seqüências de aminoácidos e entre as estruturas dos domínios de ligação ao DNA e de multimerização, os fatores de regulação da transcrição podem ser classificados em famílias, caracterizadas por motivos conservados, entre as quais podemos citar:

Genes induzidos que codificam uma resposta relacionada a (ao):

Família helix-loop-helix (HLH) (19): Proteína sem nenhum ortólogo descrito no banco de dados do Sucast. Possui o domínio HLH que geralmente está envolvido em ligações ao DNA. Fatores de transcrição pertencentes a essa família, entre eles, as proteínas bHLH, são componentes regulatórios importantes em muitas vias transcricionais relacionadas ao desenvolvimento de um organismo. São fatores envolvidos em processos como proliferação celular e diferenciação (ATCHLEY & FITCH, 1997). Proteínas HLH são caracterizadas por possuírem 2 domínios altamente conservados, o de

ligação ao DNA e o de interação com outras proteínas. O primeiro, composto principalmente por resíduos básicos, permite a ligação específica a uma seqüência de 6 nucleotídeos conhecida como Ebox (CANNTG). O segundo motivo, formado principalmente por resíduos hidrofóbicos, é chamado de domínio *helix-loop-helix* e permite interações entre proteínas e a formação de homo e heterodímeros. O motivo de dimerização contém cerca de 50 aminoácidos e se dispõe na forma de duas α -hélices anfipáticas separadas por um *loop* de tamanho variável. Algumas proteínas conhecidas como bHLH (*basic helix-loop-helix*) contêm ainda um motivo de dimerização do tipo zíper de leucinas, caracterizado por hepta-repetições de resíduos de leucina que ocorrem imediatamente após o motivo HLH, na porção C-terminal da proteína (FERREIRA, 2006).

Família MYB (20): O domínio MYB foi originalmente descrito como o domínio de ligação ao DNA do proto-oncogene MYB. Apresenta duas a três cópias de uma seqüência repetitiva composta por 51 a 53 aminoácidos com três resíduos conservados de triptofano, intercalados por intervalos de 18-19 aminoácidos, formando assim uma estrutura hidrofóbica. Algumas das funções desempenhadas por proteínas MYB são regulação do ciclo celular, proliferação e especificação celular KRANZ et al., 1998; EULGEM et al., 2000; TOLEDO-ORTIZ et al., 2003). A família do domínio MYB em milho estão envolvidos na regulação da biossíntese de fenilpropanóides (AVILA et al., 1993; MESHI & IWABUCHI, 1995; FORNALÉ et al, 2006). Acredita-se que este gene atue diretamente na COMT (caffeic acid O-methyl-transferase), uma enzima chave da biossíntese de lignina, já que sua superexpressão em milho e arabidopsis modulam negativamente tanto a COMT como genes chaves relacionados com a biossíntese de lignina (FORMALÉ *et al.*, 2006).

Família NAC (21 e 22): Esta família é formada por proteínas específicas de plantas que apresentam um domínio altamente conservado, definido como NAC. Este domínio foi nomeado com base nas primeiras proteínas identificadas em *Arabidopsis thaliana*: NAM, ATAF1 e 2 e CUC2 (AIDA et al., 1997). O domínio NAC pode ser subdividido em cinco subdomínios (A a E). O domínio como

um todo é rico em aminoácidos básicos (R, K e H), mas a distribuição dos resíduos positivos e negativos entre os domínios é desigual. Os subdomínios C e D são ricos em aminoácidos básicos e pobres em aminoácidos ácidos, enquanto o subdomínio B contém uma alta proporção de aminoácidos ácidos. Sinais de localização nuclear (NLS, de nuclear localization signal) putativos foram encontrados nos subdomínios C e D (KILUCHI et al., 2000). O domínio de ligação ao DNA está localizado numa região de 60 aminoácidos localizada nos subdomínios D e E (DUVAL et al., 2002). O domínio NAC consiste numa estrutura β -sheet antiparalela torcida, que se encontra com uma α -hélice N-terminal de um lado e com uma hélice menor do outro lado. Esta estrutura sugere que o domínio NAC está envolvido na dimerização destas proteínas, e a face do dímero rica em resíduos positivos se liga ao DNA (ERNST et al., 2004). Membros dessa família podem estar envolvidos em diversos processos celulares, tais como formação do meristema apical (SOUER et al., 1996), resposta a patógenos e sinalização para crescimento (XIE et al. 1999), senescência (JOHN et al. 1997; GUO et al., 2004), desenvolvimento de flores, folhas, raízes e sementes (SABLOWSKI & MEYEROWITZ, 1998; XIE et al., 2000; GE et al., 2004) e resposta a diferentes estresses (KILUCHI et al., 2000; COLLINGE & BOLLER, 2001; TRAN et al. 2004).

Genes reprimidos que codificam uma resposta relacionada a (ao):

Família MADS (23): Este nome é derivado das iniciais dos quatro membros inicialmente identificados neste grupo (<u>M</u>CM1 de levedura, envolvido na resposta a ferormônios, <u>A</u>GAMOUS de *Arabidopsis*, e <u>D</u>EFA de *Antirrhinum*, envolvidos no desenvolvimento floral, e <u>S</u>RF humano, fator de regulação de genes expressos no início do desenvolvimento). O domínio MADS é composto por 56 aminoácidos, consistindo num par de α -hélices anti-paralelas que formam um *coiled coil* (estrutura protéica muito estável na qual α -hélices sofrem torções helicoidais adicionais) e de uma estrutura antiparalela β -*sheet* dupla fita, envolvida também em interações com outras proteínas acessórias (MESHI & IWABUCHI, 1995; LUSCOMBE et al, 2000). Os fatores MADS-box mais estudados são aqueles envolvidos na determinação da identidade dos órgãos florais (COEN & MEYEROWITZ, 1991).

NAM (24): pertence a família do domínio NAC. Similar a proteína YZ1 que está em uma região de recombinação por hot spot, mas que não tem caracterização funcional e molecular alguma (YAO *et al.*, 2001). Parece ter o domínio CBS que acredita-se estar envolvido em processos regulatórios e como sensores de metabólitos celulares. Em algumas plantas, foi visto sua superexpressão em condições de estresse hídrico (comunicação oral).

HLH proteína b1 (25): Fator de transcrição similar a proteína R1 contendo o domínio HLH que controla a expressão tecido específica de antocianina , e em colmos maduros, onde ocorre o acúmulo tanto de antocianina quanto de lignina (CONSONNI *et al.*, 1991).

Família Homeobox (26): o papel dessas proteínas esta relacionado ao controle da determinação genética do desenvolvimento e diferenciação celular (VOLBRECHT *et al.*, 1991). É uma proteínas similar a KNOTED1 (KN1) (GEHRING, 1994). A sequencia é amplamente conservada entre os diversos genes homeóticos, conhecido como homedomínio, e é composto por cerca de 60 aminoácidos próximos a região C-terminal, cuja estrutrua dimensional apresenta três estruturas alfa-hélice consecutivas, com a terceira interagindo principalmente com o sulco maior da dupla fita de DNA. O domínio é composto por cerca de 50 aminoácidos, organizados numa estrutura globular que mantém a habilidade de ligação ao DNA. As hélices 2 e 3 interagem formando uma estrutura do tipo *helix-turn-helix* (MESHI & IWABUCHI, 1995; LUSCOMBE et al, 2000).

WRKY1 (27): O fator de transcrição possui o domínio WRKYGQK geralmente encontrado na família de proteinas *Zinc finger*, que é um dos domínios mais encontrados entre as proteínas de ligação ao DNA, e elas podem desempenhar as mais diversas funções. Uma grande variedade de fatores de transcrição contendo zinco foram descritas, nas quais um ou mais íons zinco estabilizam a estrutura

terciária do motivo. O clássico motivo zinc-finger é caracterizado por dois resíduos conservados de cisteína e dois resíduos conservados de histidina que ligam-se a um íon zinco, formando um tetraedro. A porção finger é composta por cerca de 30 aminoácidos que compreendem duas estruturas antiparalelas β -sheet e uma estrutura em α -hélice. Essas proteínas estão envolvidas em estresse, desenvolvimento, senescência e biossíntese de metabólitos secundários, a proteína pode ser induzida por MeJA e ácido salicílico (MESHI & IWABUCHI, 1995; LUSCOMBE et al, 2000).

Nuclease I(28): A senescência das plantas é um processo altamente regulado que é coordenado por mudanças na estrutura celular e no metabolismo das células para então ocorrer a expressão de um determinado gene (GAN & AMASINO, 1997). Num evento precoce durante a senescência ocorre o colapso do cloroplastos, com a posterior degradação da clorofila e proteínas. Após a ruptura de células, o RNA é degradado e o DNA é fragmentado e eventualmente degradado também (ORZÁEZ & GRANNEL, 1997). Um dos grupos de genes potencialmente envolvidos no processo de senescência é a enzima nuclease I. Junto com outras enzimas hidrolíticas, nucleases podem fornecer produtos de degradação do RNA e DNA para serem usados em outras partes da planta, como parte do mecanismo de nutrientes que ocorre na planta após a morte de células BLEECKER, 1998). No entanto, e apesar de vários estudos sobre a expressão genética que ocorre durante a início da senescência (Lohman et al., 1994; Oh et al., 1996; Buchanan- Wollaston, 1997; Gan & Amasino, 1997; Weaver et al., 1998), os genes que codificam a resposta a senescência, induzida por nucleases não foram identificados. Todos os organismos vivos contêm enzimas responsáveis pela degradação da fita simples de ácidos nucléicos, incluindo a proteína nuclease I (EC 3.1.30.1) (GITE & SHANKAR, 1995). As enzimas nucleases são glicoproteínas extracelulares estáveis ao calor que degradam o RNA e o DNA único agindo como endonucleases. Elas preferem pontes adjacentes a adenina e produzem oligo 69-fosforil e monucleotídeos. Diversas características bioquímicas definem essa família de enzimas: elas possuem uma massa molecular entre 31 e 42 KD, e são altamente sensíveis ao EDTA, tem um pH ótimo ácido, e precisam de Zn 2+ para serem ativadas e para sua estabilidade (Fraser & Low, 1993).

Motivo de reconhecimento de RNA(29): Muitas proteínas de ligação de RNA do núcleo e do citoplasma, incluindo pré-mRNA (precursosres de mRNA), snRNA e proteínas de ligação de pré-tRNA (precursores de t-RNA) (DREYFUSS et al, 1988), contém um ou mais exemplares do domínio de ligação-RNA com aproximadamente 90 aminoácidos e o motivo mais altamente conservado (ADAM et al, 1986; SWANSON et al, 1987). A maioria dos motivos conservados são um octapeptídeo, terminado com uma ribonucleoproteína com uma seqüência consenso (RNP-CSI), que a principal característica desse grupo de proteínas (BANDIZIULLIS et al, 1989), e esse consenso tem uma alta similaridade com fatores de transcrição (BANDIZIULLIS et al, 1989).

Genes reprimidos que codificam uma resposta relacionada a (ao):

Proteína de reparo/tolerância do DNA (DRT102) (30): para resistir à radiação de luz UV, as plantas utilizam a DRT 102 como mecanismos de blindagem. Atualmente se conhece muito pouco tanto da estrutura quanto dos mecanismos de ação da DRT. Mutantes desses genes foram totalmente vulneráveis a radiação UV de leve intensidade e teve danos a estrutura do seu DNA . Foram identificados 4 genes (DRT 100, DRT 101, DRT 102 e DRT 103) e sendo que os 2 primeiros eram específicos para danos de luz UV, e ambas as estruturas não mostram nenhuma homologia de aminoácidos com qualquer proteína de reparo de DNA conhecida. A sequência de codificação N-terminal da DRT 100 e 101, sugere que são alvos de cloroplasto. A DRT103 tem uma semelhança consistente com uma enzima ativada por luz, mas sua sequência não se assemelha a nenhuma fotoliase conhecida (PANG, 1993). Em ambos os tratamentos o gene que codifica essa enzima foi reprimido.

Ribonuclease T2 (31): Existem três famílias dentro do grupo de ribonucleases: RNase A, RNase T1 e RNase T2, com base na similaridade da sequência de aminoácidos e especificidade do substrato (STEYAERT, 1997; Del CARDAYRE, 1994). Os dois primeiros grupos, tem uma alta especificidade com o substrato, já as RNases do grupo T2 não são tão especificas. Elas apresentam aproximadamente 190 aminoácidos com uma massa molecular de 21 Da (KIMURA et al, 2004). Sua sequência de aminoácidos lhe confere muita estabilidade contra ação de enzimas proteolíticas (KIMURA et al, 2004).

Histona (32): A principal função das proteínas histonas é a compactação e organização dos cromossomos, o empacotamento do DNA. As histonas podem formar dímeros e as que formam dímeros (H2A e H2B, H3 e H4) apresentam padrões filogenéticos similares e parecem co-evoluir. H3 e H4 são muito mais conservadas que H2A e H2B, provavelmente porque elas formam um tetrâmero. Esses dímeros formam a partícula nucleossomal (KOMBER & THOMAS, 1974), que representa a primeira ordem de compactação do DNA. A ligação das histonas H1 e H5 desempenham um papel na estabilidade e formação de uma estrutura cromatínica maior (NOLL & KOMBERG, 1977). As histonas exibem um alto grau de conservação na sua sequência primária. Essas enzimas são principalmente envolvidas com a interação proteína-proteína e proteína-DNA.

Fenilalanina amônia-liase - PAL (33): enzima chave que atua na formação dos precursores de vários fenilpropanoides, que são compostos secundários que participam da composição de componentes importantes como hemiceluloses, ligninas, flavonóides e cumarinas (RAZAL et al, 1996; van HEERDEN et al, 1996; SINGH et al, 1998; TOWERS et al, 1998).

Xiloglucano endotransglicosilase (XET) (34 e 35): A enzima xiloglucano endotransglicosilase (XET) – EXGT ou EXT, pertence à família gênica XTH (xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase). De acordo com o modelo de McQueen-Mason (1996) e Cosgrove (1997*b*), a estrutura primária da

parede celular consiste em três polímeros: a celulose, hemicelulose (xiloglucano), a pectina e as proteinas estruturais. E é considerado que mudanças estruturais nessa rede são reguladas por modificações enzimáticas, dessa forma, enzimas que modificam a parede podem participar de importantes funções na regulação da plasticidade da parede celular, e a XET catalisa a transferência de um segmento da molécula de xiloglucano (doador) para outra molécula de xiloglucano (receptor), mediando à reestruturação molecular entre os polissacarídeos durante a morfogênese da parede celular (Fry et al. 1992; Okazawa et al. 1993; (Carpita and McCann, 2000; Darley et al. 2001; Steele et al. 2001; Vissenberg et al. 2001; Suda & Giorgini 2003; Cosgrove 2005; Saura-Valls et al. 2006). Os estudos associados à XET mostram a atividade e ou padrão de expressão sob diferentes condições fisiológicas em diversas espécies. Sua atividade é associada a múltiplos processos relacionados ao crescimento, rápida expansão celular, maturação de frutos além da mobilização de reservas durante a geminação (Pritchard et al. 1993; Zurek & Clouse 1994; Nishitani 1995; Smith et al. 1996; Antosiewicz et al. 1997; Oh et al. 1998; Akamatsu et al. 1999; Uozu et al. 2000; Busato et al. 2001; Ishimaru & Kobayashi 2002). Portanto, a XET pode ter um importante papel onde ocorre uma lise parcial da parede celular durante amadurecimento do fruto, zona de abscisão, durante a mobilização de reserva do xiloglucano e após a germinação, na separação celular após a mitose e na formação de placas crivadas para a condução da seiva durante o desenvolvimento de células do xilema e floema, respectivamente (Fry et al. 1992).

Celulose sintase (36 e 38): é a enzima que catalisa a síntese de D-glucanos individuais com ligações β (1-4), que formam a microfibrila de celulose, elas pertencem a família das glicosiltransferases (CAMPBELL et al, 1997; RICHMOND, 2000; RICHMOND & SOMERVILLE, 2000). A celulose, um agregado de polímeros ramificados de ligações β -1,4 ligados a resíduos de glucose, sendo sintetizada por todas as plantas. Está localizada na membrana plasmática. Corretamente designada como 'celulose sintase` de subunidade catalítica, (CesA), as proteínas CesA são expressas em todos os tecidos e tipos celulares da planta (RICHMOND, 2000). Vários membros dessa família apresentam entre 985 e 1088 aminoacidos e a identidade de sua sequencia pode variar entre 53 e 98% (RICHMOND, 2000; RICHMOND & SOMERVILLE, 2000). O mecanismo de ação da celulose sintase para a sintese da cadeia beta glucano 1-4 ainda não é conhecido, e não se sabe como as cadeias de celulose são sintetizadas pela adição de acucares simples ou dissacarídeos (RICHMOND, 2000), no entanto acredita-se que a UDP-glucose seja seu subtrato assim como acontece com as bactérias (PEAR et al, 1996). Em plantas jovens de algodão, a CesA1 foram diferencialmente expressos no desenvolvimento de fibras de algodão na síntese da parede secundaria (PEAR et al, 1996).

Expansinas (37, 39 e 40): a α -e β -expansinas, parecem estar envolvidas na regulação, além da expansão de células, uma variedade de processos de plantas, incluindo a morfogênese, amolecimento de frutos e o crescimento do tubo polínico de gramíneas através do estigma e estilo (LIE et al, 1993; KELLER & COSGROVE, 1995; WU et al, 1996; CHO & KENDE, 1997a, 1997b; LINK & COSGROVE, 1998; CIVELLO et al, 1999; ROSE et al, 2000; LEE et al, 2001). As β-expansinas são enzimas mais numerosas e mais abundantes em monocotiledôneas (LEE et al, 2001; WU et al, 2001) enquanto que as α-expansinas são mais encontradas em eudicotiledôneas, o que difere as alfa das beta, e que no primeiro caso as proteínas apresentam resíduos Cys, enquanto que nas α -expansinas falta cisteina na sua estrutura. Em análise da estrutura dos exons e íntrons parece que as α e β -expansinas estão envolvidas com um ancestral comum. Entre as alfa e beta expansinas a similaridade entre os aminoácidos chega a 20% e apresentam tamanho similares e motivos conservados e atuam de forma similar (Cosgrove et al., 1997). Essas proteínas são altamente conservadas em todos os grupos vegetais, mostrando que a função da proteína é importante dentro do grupo dos vegetais para o desenvolvimento e fisiologia (SHCHERBAN et al, 1995). Uma grande quantidade de β-expansinas é encontrada na matriz de polissacarídeos e proteína estruturais das gramíneas (LEE et al, 2001; WU et al, 2001). Suspeita-se que essas proteínas atuem em componentes da parede celular, como nas ligações beta 1,3:1,4 do β-glucano ou nos glucoranoarabinoxilanos (GAX) de espécies de gramíneas. Acredita-se que elas atuem como uma espécie de "graxa química", permitindo que os polímeros deslizem um sobre os outros, esse processo não é de degradação e, portanto, não enfraquece a parede, que poderiam causar ruptura sob pressão interna durante o crescimento (LEE et al, 2001; WU et al, 2001). Expansinas parecem afrouxar a parede através de um mecanismo incomum não hidrolítico que perturba a aderência não covalente de polissacarídeos da parede para uma matriz ou para microfibrilas de celulose, que retira a sua força mecânica a partir de ligações de hidrogênio entre as fibrilas de celulose (COSGROVE, 1993a; COSGROVE, 1999). Expansinas são genes diferencialmente regulados por sinais ambientais e hormonais, e elementos de regulação hormonal têm sido encontrados em suas regiões de promotor (LEE et al, 2001).

As UDP-glucose desidrogenases (UDGH) (41): são um pequeno grupo de enzimas que possui a capacidade de catalisar a oxidação da NAD-2 dependente de um álcool para um ácido, sem a necessidade de um aldeído intermediário: UDP-glicose + 2 NAD (+) + H (2) O = UDP-glucuronate + 2 NADH. As enzimas têm uma ampla gama de funções. Em plantas UDP-glicose desidrogenase, é uma enzima importante na síntese de hemicelulose e pectina, que são os componentes da parede celular recém-formado. Em Polpulus o gene foi expresso predominantemente na diferenciação do xilema e folhas jovens, com pouca expressão na zona do floema do caule. Nas folhas, a expressão foi dimuída por suprimento de curto prazo com sacarose, sorbitol e polietilenoglicol, e este efeito foi, de certa forma semelhante por exposição à luz (JOHANSSON et al, 2002). Acredita-se que Ugdh é regulado por uma via osmótica dependente, possivelmente relacionado com a disponibilidade de de precursores de carboidratos osmoticamente ativos para UDP-glucose, um substrato da UGDH (JOHANSSON et al, 2002). A UDP-glucose foi fortemente induzida por sacarose e sorbitol, o suprimento de sacarose tem um aparente efeito no conteúdo da proteína, sugerindo que a UDP-glucose desidrogenase é regulada
tanto a níveis pós-transcrionais como transducinais, o mesmo mecanismo de controle foi observado em *Arabidopsis* (SOKOLOV et al, 1998; DEJARDIN et al,1999).

Complexo LHC (light-harvesting complex) (42, 43 e 47): esse complexo é composto de clorofila A e B (complexo antena) e a proteína de ligação destas clorofilas (PAULSEN, 1995; GREEN & DURNFORD, 1996). O complexo funciona como um receptor de luz que capta e distribui a energia de excitação para os fotossistemas I e II, com o qual está intimamente associado (LI et al, 2004). Em condições de mudança de luz, a fotofosforilação da proteína que liga a clorofila AB é um processo reversível, que permite equilibrar a energia de excitação entre os dois fotossistemas, por que embora eles operem em série, eles estão localizados em distintas regiões da membrana do tilacóide, possuem diferentes propriedades de absorção da luz (ANDERSON, 1999). O N-terminal da proteína de ligação da clorofila AB se estende até o estroma onde está envolvido com a adesão das membranas granais e é foto-regulada por fosforilação reversível por seus resíduos treonina. Acredita-se que ambos os processos sirvam para mediar a distribuição da energia de excitação entre os fotossistemas I e II (ALEN, 1992; ARO & OHAD, 2003). Esta família também inclui a proteína do fotossistema II Psbs, que desempenha um papel no queima (uso) da energia dependente que aumenta a dissipação térmica devido ao excesso de energia de luz absorvida no fotossistema (DEMMING-ADAMS, 1990; FRANK et al, 1994; MA et al, 2003; LI et al, 2004).

Fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) (44): A PEPC, é uma enzima encontrada em todos os vegetais e ela catalisa a formação do oxalacetato a partir do fosfoenolpiruvato (PEP) e um íon hidrocarboneto, usando MG2+ ou Mn2+ como cofator (O'LEARY, 1982; ANDREO et al, 1987; GONZALEZ et al, 1989; LEPINIEC et al, 1994; CHOLLET et al, 1996). Esta reação é aproveitada pelas plantas C₄ para capturar e concentrar o dióxido de carbono nas células da bainha do feixe vascular (LATZO & KELLY, 1983). PEPC também desempenha um papel abastecendo oxaloacetato

no ciclo TCA, que requer a participação contínua de moléculas de C₄, a fim de reabastecer os intermediários removidos para a biossíntese de aminoácidos. O C terminal da enzima contém o sítio ativo que inclui um resíduo de lisina conservada, envolvidas em substrato de ligação, e outros resíduos conservados importantes para o mecanismo catalítico (CHOLLET et al, 1996, VIDAL & CHOLLET, 1997; NIMMO, 2000). Proteínas-quinase podem ter envolvimento no processo de regulação da PEPC (VIDAL & CHOLLET, 1997; NIMMO, 2000; TAYBI et al, 2000; TSUSCHIDA et al, 2001; SAZE et al, 2001).

Piruvato ortofosfato dikinase (PPDK)(45): a enzima catalisa a reação: <u>ATP</u> + piruvato + fosfato $\langle = \rangle$ <u>AMP</u> + fosfoenolpiruvato + difosfato, e é uma enzima chave na fotossíntese das plantas que utilizam a via fotossintética C₄ para a fixação do CO₂ (HATCH & SLACK, 1968; SUGIYAMA, 1973). O gene C₄-PPDK no milho é constituído por 19 exons que mede cerca de 12 kbp. O gene é transcrito a partir de dois diferentes sítios de iniciação sob o controle de dois promotores para produzir dois mRNAs de diferentes tamanhos. O maior contém uma sequência de exon 1 que codifica o peptídeo de trânsito no cloroplasto e esse produto age como C₄-PPDK no cloroplasto, enquanto que o menor não contém a seqüência e seu produto pode funcionar como uma enzima C₃ no citosol (MATSUOKA, 1995). Este sistema de promotor duplo incomum não é exclusivo para o milho (C4) essa organização também é observada no arroz (planta C₃). Assim, o sistema de dois-promotores é comum aos genes PPDK de de plantas C₃ e C₄, mono e dicotiledôneas (MATSUOKA, 1995).

Triose fosfato isomerase (TIM) (46): é a enzima glicolítica que catalisa a interconversão reversível de gliceraldeído 3-fosfato e dihidroxiacetona (LOLIS et al, 1990). TIM tem um papel importante em várias vias metabólicas e é essencial para uma eficiente produção de energia. A TIM é um dímero de subunidades idênticas, cada uma delas é composta de cerca de 250 resíduos de aminoácidos (KNOWLES, 1991; JOGL et al, 2003). Um resíduo de ácido glutâmico está envolvido no mecanismo catalítico. A estrutura terciária da TIM tem oito beta / alfa motivos dobrados em uma

estrutura de barril. O barril TIM prega ocorre ubiquamente e é encontrado em inúmeras outras enzimas que podem estar envolvidos no metabolismo energético, metabolismo da macromolécula, ou metabolismo molécula pequena (NAGANO et al, 2002). A seqüência de todo o resíduo sítio ativo é perfeitamente conservada em todas as TIM. Muitos dos substratos/co-fatores incluem uma molécula de fosfato, que é geralmente, mas nem sempre ligado com o C-terminal da seqüência.

Genes reprimidos que codificam uma resposta relacionada a (ao):

Aconitase hidratase (48): é uma proteína ferro-enxofre que contém uma 4Fe [-4S] e catalisa a interconversão de citrato e isocitrato via intermediáro cis-aconitato. Possui funções tanto no TCA (ciclo do ácido tricarbolíxico) quanto no ciclo do glioxilato, porém ao contrário da maioria das proteínas ferro-enxofre, que funcionam como transportadores de elétrons, o 4Fe [-4S] reage diretamente com um substrato da enzima (JEFFERY, 1999; SRIRAM et al, 2005). Em eucariontes há uma forma citosólica (cacn) e uma forma mitocondrial (MACN) da enzima.

MACN eucariótico catalisa a segunda etapa do ciclo do TCA mitocondrial, que é importante para a produção de energia, fornecendo elétrons de alta energia na forma de NADH e FADH2 para a via de fosforilação oxidativa mitocondrial. O ciclo do TCA também fornece precursores para produção de aminoácidos. Esta enzima tem um papel essencial na manutenção do DNA mitocondrial (mtDNA):
MACN age para estabilizar o mtDNA, formando parte do complexo de proteína do DNA mitocondrial, conhecidas como nucleoides. MACN é usado como um modelo reversível que pode influenciar diretamente a expressão do gene mitocondrial, em resposta às mudanças no ambiente celular. Portanto, MACN pode influenciar a expressão de componentes da via de fosforilação oxidativa codificada no DNA mitocondrial.

• enzima cacn eucariótica equilibra a quantidade de citrato e isocitrato no citoplasma, que por sua vez cria um equilíbrio entre a quantidade de NADPH gerados pela isocitrato desidrogenase com uma quantidade de acetil-CoA gerado pelo citrato a partir do citrato liase. A forma enzimática de cacn predomina quando os níveis de ferro são normais, mas se cair o suficiente para causar a desmontagem do [4FE-4S], então cacn sofre uma mudança conformacional de uma enzima compacto para um L mais aberta em forma de proteína conhecido como proteínas reguladoras de ferro 1 (IRP1; ou IRE-binding protein 1, IREBP1). IRP1 funções na regulação pós-transcricional de genes envolvidos no metabolismo do ferro - que se liga ao ferro (IRE), que incluem L ferritina e subunidades H (armazenamento de ferro), transferrina (chaperone plasma de ferro), receptor de transferrina (captação de ferro em células), ferroportin exportador de ferro, MACN, succinato desidrogenase, erythroid sintetase do ácido aminolevulínico (biossíntese tetrapirrol), entre outros.

Anidrase carbônica (CA) (49): é uma enzima que catalisa a conversão reversível do dióxido de carbono e água em ácido carbónico (CO2+ H2O<-->HCO3(-)+H+). Essa reação ocorreria naturalmente na água, mas tão devagar que seria incompatível com as trocas de gases que ocorrem constantemente para a manutenção da vida. A enzima anidrase carbónica acelera essa reacção a uma taxa de 10⁴ a 10⁶ reacões por segundo (Kanai and Edwards, 1999). A CA está restrita a tecidos verdes em plantas e seu papel tem sido associado a fotossíntese (CHEN et al, 1970; EVERSON et al, 1968; EVERSON, 1970; GRAHAM et al, 1971; GRAHAM & REED, 1971). Em plantas as CA ainda nao foram totalmente elucidades, mas parece existir dois grupos: um que esta presente somente em dicotiledôneas e outro somente nas monocotiledôneas, e ambos os casos parece haver duas isoenzimas para cada grupo. Ela possui em sua estrutra átomo de zinco por subunidade (KONDO et al, 1952; ROSSI et al, 1969). Acredita-se que há dois locais de CA nos cloroplastos: sendo um dentro do plastídeo e outro sobre a superfície. Acredita-se que há necessidade de catalisar a interconversão de CO2 e HCO nos dois locais durante a fixacção do CO2 no processo de fotossíntese (Kanai and Edwards, 1999; COUSINS et al, 2006). Acredita-se que a CA e a PEPC tenham um importante papela na refixação do dióxido de carbono, gerando malato para ajudar na biossíntese de aminoácidos e ácidos graxos. Em trigo, as CA foram encontradas nos cloroplastos e citoplasma das células do mesofilo, além dos vasos de xilema, mas em geral elas estão presentes em vários órgãos e tecidos das plantas.

Subunidade de centro de reação do fotossistema I, subunidade N (PSI-N) (50): esta família contém vários proteínas da subunidade N do centro de reação do fotossistema I (PSI-N) proteínas (Scheller et al., 1997. A proteína não tem função conhecida, embora seja localizada no lúmen dos tilacóides. PSI-N é uma pequena subunidade extrínsica que fica ao lado e é muito provável envolvidos no suporte a plastocianina. Em plantas superiores, o complexo PSI é composto por pelo menos 17 subunidades diferentes, LHC I. Os componentes de transferência de elétrons do PSI são os centro de centro de reação P700 (uma clorofila), o aceptor primário A0 (uma molécula de Chl a), do aceptor secundário A1 (uma molécula de filoquinona), e os [Fe 4 S-4] centros de ferro-enxofre FX, FB e FA (Scheller et al., 1997; Schubert et al., 1997). P700 está ligado a dois grandes centro de reação polipeptídicos PSI-A e PSI-B, perto da lado da membrana tilacóide, e é, portanto, acessível a Plastocianina, o doador de elétron secundário que está localizado no lúmen do tilacóide. A plastocianina funciona como um transportador de elétrons, que é reduzido pela citocromo f no complexo do cytochromeb6f e oxidado pelo P700, mediando assim a transferência de elétrons entre o PSII eo PSI. Todos os componentes de transferência de elétrons ea maioria se não todos pigmentos em PSI são vinculados aos três subunidades PSI-A, B e C (Schubert et al., 1997). A sequência completa do PSI-N foi primeiramente relatada em cevada (Knoetzel and Simpson, 1993) e foi posteriormente em várias outras espécies de plantas superiores incluindo a A. thaliana (Sehnke and Ferl, 1995). O PSI-N pode ser dissociado do complexo PSI, concluindo-se estar localizado externamente ao complexo (He and Malkin, 1992; (Jansson et al., 1996). Ele foi encontrado somente em PSI que também contêm LHC I, portanto, embora PSI-N não pareça ser uma proteína clorofila que poderia ser uma componente do LHC que em vez de PSI ou poderia ser um ligador proteína de ligação LHC I e PSI. As investigações mostraram que na dissociação química do PSI-N do complexo PSI não houve qualquer envolvimento da subunidade no transporte de elétrons (He and Malkin, 1992).

Ferredoxinas (51): são uma família de proteínas transportadoras de elétrons com um cofator de ferro-enxofre que atuam em uma variedade de reações metabólicas. Ferredoxinas podem ser divididas em vários subgrupos, dependendo da natureza fisiológica do cluster ferro-enxofre e de acordo com a semelhança da seqüência. Os membros representantes da família 2Fe-2S ferredoxina que têm uma estrutura geral do núcleo constituído de beta (2)-alfa-beta (2), que inclui as putidaredoxina, terpredoxina e adrenodoxina (MO et al, 1999; ARMENGAUD et al, 2001BEILKE et al, 2002; SEVRIOUKAVA, 2005). Eles são proteínas com cerca de cem aminoácidos com quatro resíduos de cisteína conservados para que o cluster 2Fe-2S cluster esteja ligado. Esta região conservada também é encontrada em vários domínios de enzimas metabólicas e proteínas de multidomínios, tais como (Nterminal) da aldeído oxidorredutase, N-terminal) da xantina oxidase, (C-terminal)da ftalato dioxigenase redutase, (N-terminal) da succinato desidrogenase ferro-enxofre e da (N-terminal) redutase monooxygenase metano.

Frutose bifosfato aldolase (52): A frutose bifosfato aldolase, é uma enzima glicolítica que catalisa a clivagem reversível da beta-frutose 1,6-bifosfato em fosfato diidroxicetona e gliceraldeído 3-fosfato (PERTHAM, 1990; MARSH & LEBHERZ, 1992), que esta envolvida com a via da glicólise/neoglicogênese e via das pentoses. Em plantas elas apresentam duas isoformas, chamadas de frutose bifosfato aldolase do cloroplasto e do citosol (Lebherz et al. 1984). A frutose do cloroplasto é uma enzima essencial para o ciclo de Calvin, em que os produtos gerados pela sua atividade participam da via de biossintese do amido (Sonnewald et al. 1994), enquanto que a do citosol participa da via de biossintese de sacarose. No entanto a frutose bifosfato aldolase do citosol, também é uma enzima chave na via glicolítica e da neoglicogênese tanto em tecidos fonte quanto nos tecidos dreno (Barry et al. 1998; Gross et al. 1999).

Beta-D-glucosidase (53, 54 e 66): são os principais membros da família GH1 e GH3 da glicosil hidrolase, e são responsáveis pela hidrólise dos resíduos beta-Glc na região terminal nãoredutora, nos oligossacarídeos, polissacarídeos ou gluco-conjugados. Em plantas as beta-glucosidases estão envolvidas em várias funções, incluindo lignificação (Dharmawardhana et al., 1995), regulação da atividade biológica das citocininas (Brzobohaty' et al., 1993; Falk and Rask, 1995; Haberer and Kieber, 2002), controle da biossíntes de ácido indol acético (Ljung et al., 2001; Persans et al., 2001), defesa contra patógeno e herbivoria (Niemeyer, 1988; Sicker et al., 2000; Zagrobelny et al., 2004). Alguns produtos secundários em plantas ocorrem a partir da glu-conjugação com uma ou duas moléculas de glucose, unidades estas que são agregadas a partir da ação da enzima do grupo glicosil hidrolase, formando dímeros, oligômero entre outros. Um sistema de classificação das glicosil hidrolases, com base na similaridade da seqüência, levou à definição de 29 famílias diferentes em plantas (que podem ser visualizadas em <u>http://afmb</u>. cnrs-mrs.fr/CAZY/).

Proteínas quinases (PKs) (55, 56, 57, 58, 59, 67, 68, 69, 70, 71, 72,73): As proteínas quinases constituem uma família de grande importância e são uma das maiores famílias gênicas (representam 4% de todos os genes em *A. thaliana*) (Chevalier e Walker, 2004). Recentemente novos membros da família quinase tem sido descobertos. Elas são definidas como enzimas que transferem um grupo fosfato de um doador fosfato (geralmente ATP) para um aminoácido receptor em um substrato protéico, que é fundamental para as células e muitos componentes de cascatas de sinalização celular são regulados mediante reações de fosforilação/desfosforilação, que ocorrem através delas, o processo inverso e catalisado pela proteína fosfofosfatase (Yanhui *et al.* 2006). Foram comparadas estruturas de quinases inativas com as quinases ativas, e foi visto que ocorrem alterações estruturais em vários elementos do núcleo quinase catalítico, o que sugere o envolvimento dele no controle da atividade da enzima. As PKs caem em três classes, caracterizadas com relação à especificidade do substrato : Pk serina/treonina, Pk tirosina-quinases e dupla PKs específica (por exemplo, MEK - fosforila tanto Thr e

Tyr em proteínas-alvo) (Rocha *et al.*, 2007). AS proteínas Mitogen-ativadas (**MAPK**)(**58**): fazem parte da família das proteínas quinsases, e são conhecidas como serina-treonina eucariótica mitogenactivated protein (MAP) quinases. São reguladores essenciais dos sistemas de transdução de sinal celular e são conservados de *S.cerevisiae* aos seres humanos (WIDMANN et al, 1999; LIGTERNIK & HIRT, 2001; JONAK et al, 2002; JOHNSON & LAPADAT, 2002; ; KIR, 2002) . Vias de sinalização de MAPK são cascatas diferencialmente regulados por fatores de crescimento, mitógenos, hormônios e estresse que mediam o crescimento celular, diferenciação e sobrevivência. A atividade MAPK é regulada através de um (normalmente) ou de três reações em cascata composto de um MAPK, um MAPK quinase (MAPKK) e MAPK quinase quinase (MAPKK). Substratos para as MAPKs incluem outras quinases e fatores de transcrição. A via de MAPK em vegetais tem atraído muitos estudos, uma vez que elas participam de importantes funções na sinalização de hormônios e processo de desenvolvimento (WIDMANN et al, 1999; LIGTERNIK & HIRT, 2001; JONAK et al, 2002; JOHNSON & LAPADAT, 2002; ; KIR, 2002) e recentemente também relataram sua atividade na presença de açúcares (Roitsch et al, 2003).

Genes reprimidos que codificam uma resposta relacionada a (ao):

Invertase da parede celular (60): As invertases compreendem uma família multigênica que inclui duas subfamílias; a das invertases ácidas e das invertases neutras/alcalinas (Tymowska-Lalanne & Kreis 1998; Vargas et al. 2003). As enzimas estão envolvidas em processos catabólicos da sacarose e a hidrólise ocorre de forma irreversível liberando hexoses (frutose e glucose) (Weber et al. 1995; Kingston-Smith et al. 1999).

As invertases podem ser distinguidas de acordo com suas propriedades bioquímicas, localização subcelular, ponto isoelétrico e pH ótimo (Gallagher et al. 2004). As ácidas possuem um pH ótimo ácido e podem ser divididas em duas classes: insolúvel ligada à parede celular e solúvel localizada no lúmen

do vacúolo. Ambas são normalmente encontradas nos órgãos imaturos das plantas (Lee & Sturm 1996; Gallagher et al. 2004). As invertases neutra/alcalinas têm um pH ótimo neutro ou alcalino, estão localizadas no citoplasma e normalmente são encontradas nos tecidos maduros das plantas (Copeland 1990; Lee & Sturm 1996). Também existem estudos que revelam que essas invertases já foram observadas nas mitocôndrias (Ji et al. 2005). De acordo com estudos em diferentes espécies a atividade das invertases de uma forma geral pode ser controlada por fatores como a presença de hormônios, fluxo de carbono e presença de luz e suas funções podem ser atribuídos a diversos processos de expansão celular e desenvolvimento em várias plantas analisadas, conforme discutido por vários autores (Sonnewald et al. 1997; Sturm & Tang 1999; Koch & Zeng 2002; Bate et al. 2004; Schweinichen & Buttner, 2005). Sturm (1999) relata que as invertases regulam a entrada de sacarose em diferentes vias de utilização. Os açúcares nas plantas também regulam a expressão gênica e talvez as invertases estejam indiretamente envolvidas no controle da diferenciação celular durante o desenvolvimento da plântula (Koch 1996; Sturm 1999).

Sacarose sintase (61 e 62): A sacarose sintase compreende uma família multigênica. A enzima cliva a sacarose em presença de UDP para UDP-glucose e frutose (Baud et al. 2004). Sua atividade é atribuída a múltiplos processos fisiológicos como a fixação de nitrogênio, síntese de polissacarídeos, síntese e regulação do transporte da sacarose pelo floema, armazenamento de carbono, além de ser associados ao desenvolvimento, amadurecimento de frutos e responder a diferentes tipos de estresse (Huber & Akazawa 1986; Doehlert 1990; Geigenberger et al. 1993; Martin et al. 1993; Nolte & Koch 1993; Wang et al. 1993; Sung et al. 1994; Amor et al. 1995; Zrenner et al. 1995; Chourey et al. 1998; Ricard et al. 1998; Buckeridge et al. 1999; Gordon et al. 1999; Haigler et al. 2001; Albrecht & Mustroph 2003; Yang et al. 2004). Contudo, é difícil estabelecer uma relação funcional da enzima, por ela ser encontrada em diversos órgãos, tecidos e regiões subcelulares na planta (Wang et al. 1999). Acredita-se na existência de isoformas, uma livre no citosol e outra associada ao complexo de síntese

de polissacarídeos na membrana plasmática (Buckeridge et al. 1999, Barrat et al. 2001). A forma citosólica estaria relacionada com o suprimento de produtos do metabolismo da sacarose para o metabolismo geral, enquanto a forma de membrana estaria relacionada com o suprimento de UDP-Glc diretamente para a síntese de polissacarídeos como celulose e os β -glucanos (Amor et al. 1995; Carlson & Chourey 1996; Buckeridge et al. 1999). De qualquer forma, o mecanismo de partição de sacarose entre o citosol e a membrana plasmática é desconhecido (Barrat et al. 2001).

Estudos revelam que sua atividade pode ser controlada por invertase e ou sacarose sintase em processos transitórios durante o desenvolvimento de plantas adultas e jovens determinando o papel bioquímico da fonte e do dreno em algumas espécies (Sun et al. 1992; Heim et al. 1993; Kingston-Smith et al. 1999; Wobus & Weber 1999; Borisjuk et al. 2002, 2003; Gardiner et al. 2003; Ruan et al. 2003; Salnikov et al. 2003; Weschke et al. 2003; Schaffer et al. 2004; Yang et al. 2004).

Sacarose sintase fosfato (63): a sacarose sintase fosfato (SPS), pertece ao grupo das glicosiltransferases . Esse gurpo de enzimas esta envolvido com centenas de atividades nos organismos (Gibson et al., 2002; Lunn and MacRae, 2003; Breton et al., 2006; Horcajada et al., 2006)., uma vez que para formar dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos várias glicosiltransferases diferentes são envolvidas. Estas enzimas catalisam a transferência de moléculas de açúcar a partir de moléculas doadoras ativadas por moléculas específica- aceptor, formando ligações glicosídicas. A classificação de glicosiltransferases usando difosfato, monofostato e fosfatos açúcar (CE: 2.4.1 .-) tem sido descrita (pode ser consultada em http://www.cazy.org/). A sacarose sintase-fosfatase requer Mg 2+ ou Mn 2+ para sua atividade máxima (Porchia and Salerno, 1996) . A enzima catalisa a formação de UDP + sacarose 6P, a partir de UDP glucose + D-Frutose 6P. A enzima parece atuar com outros substratos como a ADP-glucose, mas em plantas ela tem sido relacionada apenas com UDP-Glc. Quando trabalha conjuntamente com a E.C.3.1.3.24 (sacarose fosfato fosfatos pareção torna-se irreversível.

Trealose fosfato sintase (64): é um redutor incomum de dissacarídeo em que o carbono anomérico de ambas as moléculas de glucose são ligados umas as outras em uma dupla ligação glicosídica (GIBSON et al. 2004). A principal via enzimática para a formação da trealose envolve primeiro, a transferência de glicose a partir de um doador UDP-glicose em glicose-6-fosfato para formar α , α -1, 1 trealose-6-fosfato (Elbein et al., 2003). Essa reação, no qual as configurações de duas ligações glicosídicas são definidas simultaneamente, é catalisada pela glicosiltransferase trealose-6fosfato sintase (Otsa), e a enzima deve selecionar o anômero do aceptor e atuar na conservação da configuração da ligação do doador UDP-Glc. Considerando-se as seqüências por similaridade mais de 8.700 açúcares ativados por glicosiltransferases-dependente têm sido relatados na literatura. Esta é classificada nafamília GT-20, que tem atualmente 86 membros relacionados. Elas desempenham uma variedade de funções biológicas, de armazenamento de alimentos a proteção celular de estresses ambientais, tais como desidratação, pressão, calor, choque, frio extremo, e radicais de oxigênio, e as condições de viabilidade celular são mantidas através da síntese de trealose, que pode atingir níveis de até 10-20% do peso dos organismos. É também uma componente integrante da parede celular glicolipídios de micobactérias (SINGER et al, 1998). Investigações recentes revelam também a importância do acúcar e os derivados mono-fosforilados da trehalose-6-fosfato para o crescimento embrionário de Arabidopsis thaliana através do controle de utilização de carboidratos e se mostrou essencial para o crescimento e florescimento (EASTMOND et al, 2002; Van DIJKEN et al, 2004)

Frutose-1,6-bisfosfatase (65): é uma enzima que catalisa a hidrólise da frutose-1 ,6-bifosfato em frutose-6-fosfato, essa reação é irreversível, e é considerada como sendo um importante ponto de controle (Lunn e Furbank 1999). A fructose 6-P pode ser utilizada na via de neoglicogênese, que é o processo contrário ao da glicólise, com pequenas variações de rotas alternativas. A glicólise é o processo de conversão de glicose em piruvato, gerando pequenas quantidades de ATP e NADH. É uma via central que produz importantes metabólitos precursores. Frutose 1,6-bisfosfatase tem um peso molecular de kDa 184 e apresenta quatro subunidades aparentemente idênticas de kDa 46. Essa enzima é encontrada no cloroplasto e citosol das plantas, e existem diversas isoformas, mas parece que o status da célula afeta o posicionamento da enzima (Anderson et al. 2006).

Beta-glucosidase (BGL) (66): BGL são hidrolases exo-glicosideo, que clivam a ligações das terminações não-redutoras. Essas enzimas ocorrem em todos os organismos e participam de processos biológicos fundamentais. Em bactérias, fungos e plantas elas estão envolvidas com o metabolismo da celulose e outros carboidratos (BEGUIN, 1990; BHATIA et al, 2002). Em plantas elas participam de uma variedade de processos biológicos (BRZOBOHATY et al, 1993; LEAH et al, 1995; POULTON, 1990).

As enzimas quinases 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 foram reprimas no tratemnto com GA3, mas no entanto já foram descritas acima

Heat shock proteins 70s (hsp) (74): formam uma diversa família de proteínasdo tipo chaperona envolvidas com respostas de plantas e ocorre na maioria das espécies. Hsp70s estão, envolvidas em uma variedade de reações nos processos protéicos, incluindo a importação de proteínas para o retículo endoplasmático e mitocôndria, enovelamento de proteínas, e a remodelação ou dissociação de complexos protéicos de agregados de proteína heterogêneas, como a proteína clatrina (que desempenha um importante papel no processo de formação de <u>vesículas</u> membranares no interior das <u>células de eucariontes</u>) (Young et al., 2003; Mayer & Bukau, 2005; Sousa & Lafer, 2006). Além disso, foram observadas estruturas similares em outras proteínas que são envolvidas na manutenção da integridade do <u>vacúolo</u> e no <u>endereçamento de proteínas</u>, sugerindo um mecanismo comum de interação proteína-proteína. Todos Hsp70s são compostas de um domínio nucleotide-binding (NBD) e de uma proteína substrate-binding (SBD), que posteriormente foi subdividido em sanduíche Beta (SBDb) e lfaa-helicoidal (SBDA) (SCHUERMANN et al, 2008).

Major intrinsic protein (MIP) (75), Tonoplast intrinsic protein (TIP) (76): a água é a molécula mais importante nos sistemas vivos e seus movimentos através das membranas celulares acompanha funções fisiológicas essenciais. Todas as membranas biológicas apresentam um pouco de permeabilidade a água como resultado da difusão através da dupla camada lipídica, sob a força motriz do gradiente osmótico. No entanto, algumas células são capazes de transportar a água em taxas muito aceleradas por meio de canais chamados aquaporinas (King & Agre, 1996). A descoberta dessas proteínas especializadas levou a novas informações sobre os mecanismos fisiológicos e moleculares da permeabilidade a água. Em A. thaliana foram identificados as aquaporinas y-TIP e RD28 no tonoplasto e na membrana plasmática, respectivamente (Maurel et al., 1993; Daniels et al., 1994). As aquaporinas pertencem a uma família antiga e constante das proteínas canais chamadas de família MIP com referência a MIP26 (AQPO), o Major Intrinsic proteín (Gorin et al., 1984). Todas as proteínas MIP possuem cerca de 260 resíduos de comprimento, com a excepção de duas proteínas MIP de leveduras que têm mais de 600 resíduos, como resultado do prolongado segmento N-C-terminal. Essas proteínas contém 6 domínios de transmembrana e uma característica comum a todos os membros da família é o motivo Asn-Pro-Ala (NPA), repetidos em dois ciclos opostos (Pa et al., 1991; Wktow et al., 1991; Reizer et al., 1993; Saier, 1994)., essas proteinas transportam seletivamente água (Yang & Verkman, 1997), pequenas moléculas neutras e íons para fora e entre as células, uma vez que elas estão presentes nas membranas plasmáticas. Plantas neutralizam as flutuações no suprimento de água, regulando todas as aquaporinas presentes na membrana plasmática das células (FROGER et al, 2008). O fechamento dos canais resulta acontece a partir da fosforilação de dois resíduos de serina conservada sob condições de estresse hídrico, ou a partir da protonação de um resíduo de histidina conservada seguida de uma queda no pH citoplasmático, devido à anóxia durante as inundações (FROGER et al, 1998). Tonoplast intrinsic protein (TIP) (76): As plantas possuem as proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIP), que estao presentes nas membranas. Existem várias isoformas de TIP: alpha (semente), gama, (raiz), e Wsi, água (-estresse induzido). Estas proteínas podem permitir a difusão da água, aminoácidos e/ou peptídeos do interior do tonoplasto para o citoplasma.

Deidrinas (DHNs) (77): As deidrinas são caracterizadas por motivos de aminoácidos conservados chamados de segmentos K, Y ou S e sua massa molecular varia de 9 a 200 kD. São termo estáveis e apresentam grande quantidade de resíduos de glicina e lisina (Allagulova et al., 2003). Essas proteínas são induzidas não apenas por seca, mas também por frio, salinidade, tratamento por ácido abiscísico e metil jasmonato (Beck et al., 2007). As deidrinas também acumulam-se durante a maturação da semente, contudo, nesta fase, são conhecidas como *LEA (Late Embryogenesis Abundant)*. Embora estejam amplamente presentes em plantas vasculares, musgos, liquens, samambaias e algas, suas funções moleculares ainda não são bem compreendidas, já que não catalisam nenhuma reação metabólica. Parte de sua estrutura espiral é responsável pela grande capacidade desta proteína em se ligar à água e seus segmentos conservados são capazes de formarem domínios de ligação a lipídios, protegendo agregados lipídicos e domínios hidrofóbicos das proteínas.

Proteínas Tipo 2A serina/treonina fosfatases (PP2A) (78): O processo reversível de fosforilação é catalisado por proteínas quinases e fosfoproteínas, que regulam números processos biológicos. Enquanto todas as quinases apresentam uma enorme similaridade em sua estrutura primaria e tridimensional, as proteínas fosfatases constituem uma diversa família de enzimas que podem ser divididas em duas classes principais: proteínas fosfatases serina/treonina e proteínas fosfatase tirosina. A PP2A é uma proteína serina / treonina fosfatase, que em *Arabidopsis* tem um grande grupo mais de 60 genes diferentes, elas são categorizadas em quatro grupos, de acordo com suas especificidades de substrato, que são dependentes cátions divalentes (Mumby and Walter, 1993), e sensibilidade a inibidores: tipo 1 (PP1), 1 2A (PP2A), 2B (PP2B) e 2C (PP2C) (Rodriguez, 1998; Lin et al., 1999; Meek et al., 1999)... Considerando que a PP1, PP2A e PP2B correspondem a 40% de identidade em

seus domínios catalíticos. As PP2A ,são componentes importantes nos eventos de fosforilação

reversíveis de proteínas em plantas e outros organismos. AS proteínas PP2A são complexos oligoméricos constituídos por uma subunidade catalítica ((Hendrix et al., 1993b; Strack et al., 1998) e várias subunidades reguladoras que modulam a atividade dessas fosfatases (Mumby and Walter, 1993; Janssens and Goris, 2001). A unidade catalítica é codificada por pelo menos cinco genes, cada um dos quais parece ser expresso em todos os tecidos, embora em níveis diferentes (Arino et al., 1993; Casamayor et al., 1994; Pe´rez-Callejo´n et al., 1998)... Quatro novas isoformas da subunidade reguladora da PP2A foram descritos em *A. Thaliana* (Latorre et al., 1997; Haynes et al., 1999) *e* parece ser induzida em resposta a estresse térmico (TEROL et al, 2002).

Genes reprimidos que codificam uma resposta relacionada a (ao):

Citocromo P450 (óxido sintase) (79): o nome citocromo P450 é derivado do fato que estas são proteínas celulares ('cyto') coloridas ('cromo'), com um "pigmento de 450 nm", assim chamada pela característica "pico Soret" formada pela absorção da luz de comprimento de ondas próximo a 450 nm quando o ferro hemo é reduzido (freqüentemente com <u>ditionito de sódio</u>) e complexado em <u>monóxido</u> <u>de carbono</u>. citocromo P450 (abreviado CYP, P450, com menos freqüência CYP450) é uma superfamília muito ampla e diversificada de <u>hemoproteínas</u> encontrada na <u>bactéria</u>, <u>archaea</u> e <u>eukaryotas</u>. Citocromos P450 usam compostos exógenos e endógenos como substratos nas reações enzimáticas. Geralmente elas formam parte de multicomponentes das cadeias de transferência de <u>elétron</u>, chamado de sistemas contendo P450. A reação mais comum catalisada pelo citocromo P450 é uma reação monooxigenase, isto é, inserção de um átomo de oxigênio em um substrato orgânico (RH) enquanto o outro átomo oxigênio é reduzido à água: RH + O₂ + 2H⁺ + 2e⁻ \rightarrow ROH + H₂O. Mais de 7.700 seqüências distintas de CYP são conhecidas , elas são importantes na biossíntese de muitas substâncias e na desintoxicação de xenobióticos. Nas plantas, eles estão envolvidos na biossíntese de produtos secundários (por exemplo, flavonóides, alcalóides) e hormônios, mas também na

desintoxicação de herbicidas e outros xenobióticos. Plantas contêm pelo menos dois tipos de hidroxilases flavonóides P450-dependente. Uma realiza uma única hidroxilação na posição 3'-(F3'H), de flavonóides, e a segunda realiza duas hidroxilações, tanto na posição 3'-e 5'- (F3'5'H). Acreditava-se anteriormente que a biossíntese de flavonóides envolvia um tipo de rede de compartimentação intracelular e diferentes vias, com intermediários comuns, mas atualmente acredita-se que o transporte intercelular de substratos e/ou intermediários podem ser um importante componente da compartimentação. Deve-se salientar que outros problemas podem ser ainda mais crítica nos próximos anos. Existem ainda muitos casos, em particular na biossíntese de metabólitos secundários, onde uma reação P450 é suspeita ou postulado, mas os substratos precisos ou não são claramente identificados ou não disponível. Na síntese de alcalóides as monooxigenases citocromo P450 participam da formação da camalexin (3-tiazol-2-il-indole) é um indol alcalóide, fitoalexinas produzidas por Arabidopsis thaliana que se pensa ser importante para a resistência a fungos necrotrófico. É produzido a partir de triptofano, que é convertido em indol acetaldoxime (IAOx) pela ação do citocromo P450 monooxigenases CYP79B2 e CYP79B3. As etapas restantes biossintéticas são desconhecidas exceto para a última etapa, que é a conversão de ácido dihydrocamalexic para camalexin por CYP71B15 (PAD3). Expressão de CYP79B2 e CYP71A13 em Nicotiana benthamiana resultou na conversão de triptofano a Ian (indole-3acetonitrila). Proteína superóxido dismutase, domínio Zinc finger (80): é um dos domínios mais encontrados entre as proteínas de ligação ao DNA, e elas podem desempenhar as mais diversas funções. Uma grande variedade de fatores de transcrição contendo zinco foram descritas, nas quais um ou mais íons zinco estabilizam a estrutura terciária do motivo. O clássico motivo zinc-finger é caracterizado por dois resíduos conservados de cisteína e dois resíduos conservados de histidina que ligam-se a um íon zinco, formando um tetraedro. A porção finger é composta por cerca de 30 aminoácidos que compreendem duas estruturas antiparalelas β-sheet e uma estrutura em α-hélice (Meshi e Iwabuchi, 1995; ; Luscombe et al, 2000). Sabe-se atualmente que eles também se ligam ao RNA, proteínas e/ou substratos lipídicos além do DNA. Suas propriedades de ligação dependem da seqüência de aminoácidos dos domínios. Existem muitos motivos na superfamílias Znf, variando tanto em seqüência e estrutura. Elas mostram a versatilidade considerável em modos de vinculação, mesmo entre membros da mesma classe (por exemplo, alguns ligam ao DNA, proteínas outros), sugerindo que os motivos Znf são estáveis e evoluíram para funções especializadas, eles raramente sofrem mudanças conformacionais vinculativo sobre seu alvo. Por exemplo, Znf contém proteínas envolvidas com a função na transcrição de genes, na tradução, no tráfico de mRNA, na organização do citoesqueleto, no crescimento epitelial, na adesão celular, no enrolamento de proteínas, na remodelação da cromatina e no sensoriamento de zinco. LSD1 é uma subclasse de proteínas Znf com 189 aminoácidos. LSD1 é constitutivamente expressa. Acredita-se que LSD1 regula a transcrição em resposta a sinais provenientes de células submetidas patógeno, ocorrendo a morte celular programada (PCD). Muito pouco é conhecido sobre a causa mecanismos de controle.

Tioredoxinas (**TRX**) (**81**): estão presentes em praticamente todas as espécies, as TRX interagem com uma ampla gama de proteínas por um mecanismo redox baseado na oxidação reversível de dois grupos tiol da cisteína para um dissulfeto, acompanhados da transferência de dois elétrons e dois prótons. O resultado é a interconversão de um dissulfeto e um ditiol (PETERSON et al, 2005). No redução da proteína dissulfeto NADPH-dependente, tioredoxina redutase (TR) catalisa a redução da tioredoxina oxidada (TRX) por NADPH usando usando FAD e um dissulfeto redox, essas reações de suma importância no controle de processos biológicos (Brehelin et al. 2000; Buchanan & Balmer 2004). Enquanto o genoma humano contém apenas um gene para TRX em plantas elas são uma família de proteínas complexas (Coudevylle et al. 2005). Um total de 19 genes diferentes em seis subfamílias (m, f, h, x, y, o) (PETERSON et al, 2005).

Calreticulas (CRT) (82): As calreticulinas são proteínas multifuncionais e muito conservadas envolvidas em uma variedade de processos que incluem: armazenamento e liberação de Ca+2 (Camacho

e Lechleiter, 1995; Mery et al., 1996; Arnaudeau et al.,2002), adesão celular (Coppolino et al., 1997), apoptose (Groenendyk e Michalak, 2005), síntese de proteínas e lipídios, ligação a proteínas como cofator alostérico e modificações pós transcricionais (Baumann e Walz, 2001; Michalak, 2005). Pelo fato de se ligarem a íons Ca+2 (um segundo mensageiro em vias de transdução de sinais), permitindo a liberação ou seqüestro desse íon, são proteínas-chave na participação de diferentes vias de sinalização.

UDP glicosil transferases (UGT) (83): pertence a uma superfamília de enzimas que catalisam a adição de um grupo glicosil a partir da UTP-açúcar para uma pequena molécula hidrofóbica (COUTHINO et al, 2003). As glicosiltransferases são uma família multigênica, dividida em mais de 70 famílias, que está envolvida nos processos de conjugação de hormônios, metabólitos secundários, toxinas bióticas e abióticas (CAMPBELL et al, 1997; Lim and Bowles, 2004; Bowles et al, 2005;) . A glicosilação é geralmente um mecanismo para desentoxicação ou para facilitar o armazenamento de moléculas ativas nos vacúolos das plantas (Sandermann, 1992; Paquette et al, 2003). Em plantas, um dos mecanismos mais importantes em que essas enzimas participam, consiste na transferência da glucose a partir da UDP-glucose (COUTHINO et al, 2003) para um flavonol. Essa reação é um dos últimos passos para biossíntese de pigmentos (antocianinas) (flavonóide 3-o-glicosi transferase) (OFFEN et al, 2006). Estudos mostram que essas enzimas não são tão criteriosas quanto ao seu receptor, mas o doador, geralmente e uma UDP-glucose (COLE & EDWARDS, 2000).

A família regulador pseudo-resposta 1 (PRR1) (84): pertence a uma pequena família de reguladores (APRR1 / TOC1, APRR3, APRR5, APRR7 e APRR9), e o componente mais provável que controla o ciclo circadiano em *A. thaliana* pertence a essa família.

Proteína tirosina fosfatase (pTyr) (85): a fosforilação é uma modificação pós-transducional comum que pode criar novos motivos de reconhecimento para interação proteína e localização celular, afeta a estabilidade de proteínas e regula a atividade da enzima. Por conseguinte, a manutenção de um nível adequado de fosforilação da proteína tirosina é essencial para muitas funções celulares. O nível de

fosforilação de proteínas é altamente dinâmico e qualquer perturbação pode provocar uma avaria grave da célula eucariótica. As proteínas Tirosina fosfatases específicas (PTPase; EC: 3.1.3.48) catalisam a remoção de um grupo fosfato ligado a um resíduo de tirosina, usando a enzima intermediária cisteinilfosfatase. Estas enzimas são componentes-chave de regulação em vias de transdução de sinal (como a via da MAP quinase) e controle do ciclo celular, e são importantes no controle do crescimento celular, proliferação, diferenciação e transformação. A superfamília PTP pode ser dividida em quatro subfamílias:

(1)pTyr-fosfatases específicas; (2)fosfatases de dupla especificidade dTyr (e DSER / dThr) (3)fosfatases Cdc25 (dTyr e / ou dThr); (4) fosfatases LMW (baixo peso molecular). Todas as PTPases possuem o sítio ativo altamente conservado, e a diversidade funcional entre PTPases é dotado por domínios e subunidades regulatórios. Funcionalmente, exitem dois tipos de PTPs, que apresentam uma seqüência conservada, mas no entanto, com diferença em sua estrutura: a PTP clássica, que são específicos para resíduos de tirosina, e a fosfatases de dupla especificidade (DSPs), que podem adicionalmente desfosforilar resíduos de serina e treonina. Obviamente, os resíduos catalíticos da enzima são chave para a sua função molecular. Ser /Thr fosfatase de dupla especificidade são um grupo de enzimas que atuam tanto no resíduo Ser / Thr (EC: 3.1.3.16) como na proteína Tirosina fosfatase específica (EC: 3.1.3.48) removendo a serina / treonina ou a ligação do grupo fosfato da tirosina de um vasto leque de fosfoproteínas, incluindo uma série de enzimas que têm sido fosforiladas sob a ação de uma quinase. As proteínas fosfatases de dupla especificidade (DSPs), regulam a transdução de sinal mitogênica e controlam o ciclo celular (PILS & SCHULTZ, 2004)

As proteínas Tipo PP2C serina/treonina fosfatases (86), não têm seqüência aparente de homologia com as outras classes de fosfatases (COHEN & COHEN, 1989). Enzimas PP2C também têm a característica única de funcionar como monômeros, Considerando que todas as outras classes de fosfatases serina / treonina são encontrados em complexos oligômero com regulamentação

subunidades, que provavelmente regulam a atividade, substrato especificidade e / ou localização celular das fosfatases (COHEN, 1989; COHEN & COHEN). PP2Cs também diferem de outras fosfatases serina / treonina em que eles requerem Mn2 e / ou Mg2 e são insensíveis a o inibidor da fosfatase ácida ocadaíco (COHEN, 1989).

Major facilitator superfamily (MFS)(87): Os sistemas de transporte permitem a absorção de nutrientes essenciais e íons, a excreção de produtos finais do metabolismo e substâncias deletérias e comunicação entre as células e os meio ambiente (MITCHELL, 1967a). Eles também fornecem elementos essenciais dos sistemas de geração e consumo de energia (MITCHELL, 1967b). Transportadores primários ativos conduzem o acúmulo ou eliminação de solutos através da hidrólise de ATP, a absorção de fótons, o fluxo de elétrons, descarboxilação do substrato, ou a transferência de grupos metila (DIMROTH, 1997). Se moléculas são unidirecionalmente bombeadas como uma conseqüência do consumo de uma fonte primária de energia celular, resultado de potenciais eletroquímicos (MITCHELL, 1967b). A conseqüência de energia quimiostática gerada pode ser usada para conduzir o transporte ativo de solutos adicionais via carreadores secundários que facilita o transporte de uma ou mais espécies moleculares em através da membrana (MALONEY, 1990). Estudos têm revelado a ocorrência de dezenas de famílias de transportadores primários e secundários (PAULSEN et al,1998). Duas famílias tenham sido encontrados em todas as classificações dos organismos vivos: a superfamília ATP-binding cassette (ABC) (DEAN & ALLIKMETS, 1995; FATH & KOLTER, 1993; HIGGINS, 1992; KUAN et al, 1995) e a superfamília dos major facilitator superfamily (MFS) (BALDWIN, 1993; GOSWITZ & BROOKER, 1995; GRIFFIH et al, 1992; HENDERSON, 1991; MARGER & SAIER, 1993). Enquanto que a família permease ABC, são em geral transportadores ativos primários, capazes de transportar tanto pequenas moléculas quanto macromoléculas em resposta a hidrólise de ATP (PAULSEN et al, 1997), os transportadores MFS são carreadores secundário de polipeptídeos, capazes de transportar pequenos solutos em resposta a

gradientes quimiosmóticos de íons. Os MFS são agrupados em dezessete famílias (MARGER & SAIER, 1993), onde quatro delas são encontradas em plantas: família 1: é a maior família, que é constituída pelo portador de açúcar (SP) com 133 membros identificados (BALDWIN, 1993; BOLES & HOLLENBERG, 1997; GOSWITZ & BROOKER, 1993; GRIFFITH et al, 1992; HENDERSON, 1991; HENDERSON & MAIDEN, 1990; MAIDEN et al, 1987; OLSON & PESSIN, 1996). Substratos transportados por membros da família SP incluem hexoses, pentoses, monossacarídeos, dissacarídeos, inositóis quinato, e cátions orgânicos. Mas a maioria nem todos os membros da família SP pode catalisar o transporte de carboidratos. As regiões hidrofílicas das proteínas eucarióticas podem desempenhar um papel na regulação ou na fixação domcitoesqueleto, e eles estão freqüentemente sujeitos a fosforilação de cinases ATP-dependentes um representante bem caracterizados da família de SP é a arabinose (PAO et al, 1998) . O transportador de nitrato-nitrito (família 8 PNN). Estas proteínas catalisam ou absorção de nitrato ou efluxo de nitrito. A energia de dissociação mecanismos não é bem definida. Fosfato: symporter H1 (família 9 PHS), tem representantes sequenciados somente em leveduras e plantas (PAO et al, 1998). As 11 proteínas da família PHS são bastante uniformes em tamanho, mas são substancialmente maiores do que as proteínas MPS de bactérias e todos os membros apresentam a mesma função está relacionada com o transporte de fosfato inorgânico. Por último temos a família 18, que é o transportador oligopeptídeo próton-dependente (POT), que tem relação com o transporte de peptídeos, aminoácidos, nitrato e nitrito (PAO et al, 1998).

ANEXO 7. Tabela com composição dos monossacarídeos neutros da fração total da parede celular de plântulas de cana-de-açúcar controle, tratadas com $GA_3 0,5 mg.L^{-1}$ e PBZ.

Composição dos monossacarídeos neutros da fração total da parede celular da parte aérea de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* na presença de PBZ 0,05mg.L⁻¹ e diferentes concentrações de GA₃ em diferentes dias de coleta. A análise estatística foi feita de forma global entre os mesmos monossacarídeos. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \le 5\%$). As letras maiúsculas e minúsculas foram utilizadas para ajudar a diferenciar o tipo de açúcar no qual foi feita a análise estatística.

Tempo de coleta	7 dias (MOL%)				
Monossacarídeos	ARA	GAL	GLC	XIL	MAN
Controle	16,9 ± 4,1 d E	$10,6 \pm 1,8$ cdef	31,3 ± 7,8 BCD	37,5 ± 8,8 d	3,7 ±0,06 A
Paclobutrazol	21 ± 0 E	9,29 ± 0 h	20,4 ± 0 н	49,05 ± 0 d	0,30 ± 0 C
$GA_3 0,5 mg.L^{-1}$	14,9 ± 1,6 d E	11,7 ± 0,9 cdefg	32,9 ± 2,5 BCDEF	34,95 ± 2,4 d	5,74 ± 1,6 A
$GA_3 5mg.L^{-1}$	19 ± 2,7 CDE	$7,2 \pm 1,1$ efgh	24,2 ± 3 CDEFG	49,44 ± 6,5 d	0,34 ± 0,06 C
$GA_3 20 \text{ mg.L}^{-1}$	14,2 ± 3 D E	11,9 ± 3 cdef	31,8 ± 6,4 BCDEF	36,39 ± 6,7 d	5,74 ± 1,6 A

Tempo de coleta	14 dias (MOL%)				
Monossacarídeos	ARA	GAL	GLC	XIL	MAN
Controle	$23,2 \pm 2,1$ DE	11 ± 1 defgh	22,8 ± 2,9 DEFGH	42,7 ± 4,1 d	0,3 ± 0,07 C
Paclobutrazol	21 ± 0 E	$9,3 \pm 0$ h	20,4 ± 0 н	$49,05 \pm 0 \text{ d}$	0,30 ± 0 C
$GA_3 0,5 mg.L^{-1}$	19,2 ± 1,6 CD	9,3 ± 1 cdef	22,7 ± 1,3 CDEFG	48,49 ± 2,1 d	0,30 ± 0 C
$GA_3 5 mg.L^{-1}$	27,2 ± 4,5 D E	8 ± 1,1 fgh	25 ± 1,6 EFGH	$39,53 \pm 3,2 \text{ d}$	0,32 ± 0,07 C
$GA_3 20 \text{ mg.L}^{-1}$	26,8 ± 2 D E	$7,9 \pm 0,6$ gh	20,8 ± 0,7 н	44,30 ±0.8 d	0,34 ± 0 C

Tempo de coleta	21 dias (MOL%)				
Monossacarídeos	ARA	GAL	GLC	XIL	MAN
Controle	25,1 ± 3,1 DE	6 ± 0.5 fgh	18,9 ± 2,5 GH	49,68 ± 6 d	0,30 ± 0,07 C
Paclobutrazol	$29,2 \pm 0$ de	$6,9 \pm 0$ fgh	12,6 ± 0 н	50,87 ± 0 d	0,34 ± 0 C
$GA_3 0,5 mg.L^{-1}$	22,2 ± 2,3 D E	7 ± 0,6 fgh	20,1 ± 1,4 EFGH	50,37 ± 3,6 d	0,33 ± 0,07 C
$GA_3 5 mg.L^{-1}$	24,5 ± 1,8 de	$7,3 \pm 0,6$ fgh	19,2 ± 1,5 FGH	48,7 ± 3,3 d	0,33 ± 0,06 C
$GA_3 20 \text{ mg.L}^{-1}$	$18,4 \pm 1,4$ BC	$7,4 \pm 0,7$ bcde	17,5 ± 2 BC	56,4 ± 5,3 c	$0,34 \pm 0$ C

Tempo de coleta	28 (MOL%)					
Monossacarídeos	ARA	GAL	GLC	XIL	MAN	
Controle	$21,7 \pm 1,6 \text{ AB}$	9,6 ± 2 ab	14,5 ± 1,7 BCDE	53,84 ± 18 bc	0,33 ± 0 C	
Paclobutrazol	20,37 ± 0,4 A	7,48 ± 0 a	16,92 ± 0 A	54,87 ± ab	0,37 ± 0 BC	
GA ₃ 0,5 mg.L ⁻¹	17,71 ± 1,5 B	6,90 ± 0 abcd	`18,30 ± 0,03 ABC	56,72 ± 6,1 abc	0,36 ± 0,01 BC	
$GA_3 5 mg.L^{-1}$	16,4 ± 7 B	$6,4 \pm 3,5$ abc	15,7 ± 3,5 AB	61,1 ±24 ab	0,37 ± 0,3 BC	
$GA_3 20 \text{ mg.L}^{-1}$	17 ± 8,6 AB	$6,5 \pm 0$ ab	15,3 ± 6,5 AB	60 ± 29 a	1,2 ± 1,8 AB	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ANEXO 6

- ABE, M.; KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO S, ET AL, 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. Science 309: 1052–1056.
- ABELES, F. B., MORGAN, P. W., & SALTVET, M. E., JR. 1992. Ethylene in Plant Biology, 2nd ed. (San Diego, CA: Academic Press, Inc.).
- ACHARD, P.; VRIEZEN, W.H.; VAN DER STRAETEN, D. & HARBERD, N. P. 2003. Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. Plant Cell 15: 2816–2825.
- ACOSTA, J. F.; GONZALEZ, J.; RODRIGUEZ, R. & LEON, W., 1994. Effect of growth regulator applications on the juvenile period of Valencia oranges (Citrus sinensis). Centro Agrícola, v.21, p.51-56.
- AIDA, M.; ISHIDA, T.; FUKAKI,H.; FUJISAWA,H. & TASAKA, M., 1997. Genes involved in organ separation in Arabidopsis: An analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. Plant Cell 9, 841-857.
- AKAMATSU, T.; HNZAWA, Y.; OHTAKE, Y.; TAKAHASHI, T.; NISHITANI, K., & KOMEDA, Y., 1999. Expression of endoxyloglucan transferase genes in acaulis mutants of Arabidopsis. Plant Physiol. 121: 715-721.
- ALBRECHT, G. & MUSTROPH, A., 2003. Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia. Planta 217: 252-260.
- AMITAI-ZEIGERSON, H.; SCOLNIK, P.A. & BAR-ZVI, D., 1994. Genomic nucleotide sequences of tomato Asr2, a second member of the stress/ripening-induced Asr1 gene family. Plant Physiol. 106, 1699–1700.
- ALFONSI, R.R., PEDRO JR., M.J., BRUNINI, O., BARBIERI, U. Condições climáticas para a cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. et al. Cana-de-açúcar; cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.42-55.
- ALLEN, J. F., 1992. Biochim. Biophys. Acta 1098, 275–335.
- ALMEIDA, J. A. S. & PEREIRA, M.de F.D. A., 1996. EFFECT OF GA3 AND PACLOBUTRAZOL IN THE VEGETATIVE DEVELOPMENT OF SUNFLOWER. Bras.Fisiol.Veg., 9(1):53-58.
- ALVEY, L. & HARBERD, N. P., 2005. DELLA proteins: Integrators of multiple plant growth regulatory inputs? Physiol. Plant. 123: 152–160.
- AMARAL, L. I. V. do, GASPAR, M., COSTA, P. M. F., AIDAR, M. P. M. & BUCKERIDGE, M. S., 2007. A new rapid sensitive enzymatic method fr extraction and quantification of starch in plant material. Hoehnea 34(4): 425-431
- ANDERSON, J. M., 1999. Aust. J. Plant Physiol. 26, 625–639.

ANDREO, C.S.; GONZALEZ, D.H.; IGLESIAS, A. A., 1987. FEBS Lett. 213 1-8.

- ANTOSIEWICZ, D. M.; PURUGGANAN, M. M.; POLISENSKY, D. H. & BRAAM, J., 1997. Cellular localization of Arabidopsis xyloglucan endotransglycosylase-related proteins-during development and after wind stimulation. Plant Physiol. 115: 1319-1328.
- ARENAS-HUERTERO, F.; ARROYO, A.; ZHOU, L.; SHEEN, J. & LÉON, P., 2000. Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. Genes Dev. 14, 2085–2096.
- ARIN^oO, J.; PE'REZ-CALLEJO'N, E.; CUNILLERA N, CAMPS, M.; POSAS, F.; FERRER, A., 1993. Protein phosphatases in higher plants: multiplicity of type 2A phosphatases in Arabidopsis thaliana. Plant Mol Biol 21: 475–485.
- ARIOLI, T.; PENG. L.; BETZNER, A.S.; BURN, J.; WITTKE, W.; HERTH, W.; CAMILLERI, C.; HOFTE, H.; PLAZINSKI, J.; BIRCH, R. et al, 1998. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis.

Science, 279:717-720. This paper provided the critical proof of in vivo function for the cellulose synthase genes.

ARO, E. M. & OHAD, I., 2003. Antioxid. Redox Signal. 5, 55–67.

ARORA, R. et al, 2007. BMC Genomics 2007, 8:242

- ASAI, T.; TENA, G.; PLOTNIKOVA, J.; WILLMANN, M. R.; CHIU, W.L.; GOMEZ-GOMEZ, L.; BOLLER, T.; AUSUBEL, F.M. & SHEEN, J., 2002. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. Nature 415: 977–983.
- ASAR-BOAMAH, N. & FLETCHER R., 1986. Protection of bean seedlings against heath and chilling injury by triadimefon. Physiol Plant 67:353–358
- ASHIKARI, M.; ITOH, H.; UEGUSHI-TANAKA, M.; SASAKI, A.; GOMI, K.; KITANO, H.& MATSUOKA, M., 2003. Gibberellin signal transduction in rice. J. Plant GrowthRegul. 22: 141–151.
- ATCHLEY, W. R. & FITCH, W. M., 1997. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. PNAS, USA 94:5172–5176.
- AVILA, J.; NIETO, C.; CAÑAS, L.; BENITO, M. J. & PAZ-ARES, J., 1993. Petunia hybrida genes related to the maize regulatory C1 gene and to animal myb proto-oncogenes. Plant J. 3(4):553–562.
- AZUMA T, UENO, S; UCHIDA, N.; YASUDA, T., 1997. Gibberellin induced elongation and osmoregulation in internodes of floating rice. Physiol Plant 99:517–522
- BAENA-GONZALEZ, E.; ROLLAND, F.; HEVELEIN, J.M. & SHEEN, J., 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling, Nature 448, pp. 938–942. View Record in Scopus | Cited By in Scopus (66)
- BALDWIN, S. A. 1993. Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. Biochim. Biophys. Acta 1154:17–49.
- BALK, P. A. & DE BOER A. D., 1999. Rapid stalk elongation in tulip (Tulipa gesneriana L. cv. Apeldoorn) and the combined action of cold-induced invertase and the water-channel protein c TIP. Planta 209:346–354.
- BARIOLA, P. & GREEN, P.J., 1997. Plant ribonucleases. In G D'Alessio, JF Riordan, eds, Ribonucleases: Structure and Function. Academic Press, New York, pp 163–190.
- BRETON, C., SNAJDROVA, L., JEANNEAU, C., KOCA, J., & IMBERTY, A., 2006. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. Glycobiology 16: 29R–37R.
- BARLOW, F. W. R.; BOERSMA, L. & YOUNG, J. L., 1976. Root temperature and soil water potential effects on growth and soluble carbohydrate concentration of corn seedlings. Crop Sci 16:59–62.
- BARRATT, D. H. P.; BARBER, L.; KRUGER, N. J., SMITH, A. M.: WANG, T. L. & MARTIN, C., 2001. Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. Plant Physiol. 127: 655-664.
- BARRETT, T., SURESH, C. G.; TOLLEY, S. P., DODSON, E. J., HUGHES, M. A., 1995. The crystal structure of a cyanogenic b-glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. Structure 3: 951–960
- BEGUIN, P., 1990. Molecular biology of cellulose degradation. Annu. Rev. Microbiol. 44, 219–248.
- BETKE, P. C. & JONES, R. L., 1998. Gibberellin signaling. Curr. Opin. Plant Biol. 1: 440-446.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M., 1983. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: development, germination and growth. Berlin. Springer-Verlag, 306p.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S. & BISARIA, V. S., 2002. Microbial betaglucosidases: cloning, properties, and applications. Crit. Rev. Biotechnol. 22, 375–407.
- BIAŁECKA, B. & KEPCZYNSKI, J., 2003. Regulation of a-amylase activity in Amaranthus caudatus seeds by methyl jasmonate, gibberellin A3, benzyladenine and ethylene. Plant Growth Regul 39:51–56
- BIRNEY, E.; KUMAR, S. & KRAINER, A. R., 1993. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. Nucleic Acids Res 21, 5803–5816.

BLA'ZQUEZ, M. A.; LAGUNAS, R.; GANCEDO, C.; GANCEDO, J. M., 1993. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. FEBS Lett 329: 51–54

BLUMWALD, E., 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. Curr. Opin. Cell Biol. 12, 431-434.

BOHNERT, H. J. & SHEN, B., 1999. Transformation and compatible solutes. Sci. Hortic. 78, 237-260.

- BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E. & JENSEN, R. G., 1995. Adaptations to environmental stresses. Plant Cell 7: 1099–1111
- BOLES, E. & C. P. HOLLENBERG. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. FEMS. Microbiol. Rev. 21:85–111.
- BOLLE, C., 2004. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. Planta 218: 683–692.
- BOLLE, C., 2004. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. Planta 218 683-92.
- BRADFORD, K. J.; DOWNIE, A.B.; GEE, O. H.; ALVARADO, V.; YANG, H. & DAHAL, P., 2003. Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds, Plant Physiol. 132, pp. 1560–1576. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (26)
- BRADY, S. M. & McCOURT, P., 2003. Hormone cross-talk in seed dormancy. J. Plant Growth Regulation, New York, v. 22, p.25-31.
- BRAY, E. A., 1993. Molecular responses to water deficit. Plant Physiology. 3, 1035-1040.
- BRAZIER-HICKS, M., OFFEN, W. A., GERSHATER, M. C.; REVETT, T. J.; LIM, E.; BOWLES, D. J.; DAVIES, G. J. & EDWARDS, R., 2007. Characterization and engineering of the bifunctional N- and Oglucosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. PNAS. vol. 104 _ no. 5120238–20243
- BRENNER, ML.; CHEIKH, N., 1995. The role of hormones in photosynthate partitioning and seed filling. In: Davis PJ (ed) Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology, 2nd edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 649–670
- BRODERSEN, P.; PETERSEN, M.; BJORN NIELSEN, H.; ZHU, S.; NEWMAN, M. A.; SHOKAT, K. M.; RIETZ, S.; PARKER, J. & MUNDY, J., 2006. Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. Plant J. 47: 532–546
- BUCHANAN-WOLLASTON, V., 1997. The molecular biology of leaf senescence. J Exp Bot 48: 181-199
- BURMEISTER, W. P;. COTTAZ, S.; DRIGUEZ, H,; IORI, R,; PALMIERI, S.; HENRISSAT, B., 1997. The crystal structures of Sinapis alba myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. Structure 5: 663–675
- BUXTON, G. F.; CYR, D. R.; DUMBROFF, E. B.; WEBB, D. P., 1985. Physiological responses of three northern conifers to rapid and slow induction of moisture stress. Can J Bot 63: 1171–1176
- CANEL, C.; BAILEY-SERRES, J. N. & ROOSE, M. L.,1995. Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. Plant Physiol. 108,1323–1324.
- CAO, D.; HUSSAIN, A.; CHENG, H. & PENG, J., 2005. Loss of function of four DELLA genes leads to lightand gibberellin-independent seed germination in Arabidopsis. Planta 223: 105–113.
- CARLSON, S. J. & CHOUREY, P. S., 1996. Evidence for plasma membrane-associated forms of sucrose synthase in maize. Mol. Gen. Genet. 252: 303-310.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; ANTUNES, L. E. C.; SILVA, A. T., 1998. Efeito do ácido gibelérico e Benzilaminopurina no crescimento invitro de embriões do cafeeiro cv. Acaiá. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 33, p. 847-851.
- CASAMAYOR, A.; PE'REZ-CALLEJO'N, E.; PUJOL, G.; ARIN⁻, O. J.; FERRER, A., 1994. Molecular characterization of a fourth isoform of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A from Arabidopsis thaliana. Plant Mol Biol 26: 523–528.

- CATALÁ, C.; ROSE, J. K. C., BENNETT, A.B., 1997. Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4ß-D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. The Plant Journal 12, 417–426.[CrossRef][Web of Science][Medline]
- CATO, S. C., 2006. Acao de bioestimulantes nas culturas de amendoinzeiro, sorgo e trigo e interações hormonais entre auxinas, citocininas e giberelinas. Piracicaba(doutorado) 74 p.
- CHANDLER, P.M.; MARION-POLL A; ELLIS, M, GUBLER, F., 2002. Mutants at the Slender1 locus of barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization. Plant Physiol 129:181–190
- CHANG, S.; PURYEAR, J. D.; DIAS, M. A. D. L.; FUNKHAUSER, E. A.; NEWTON, R.G. & CAIRNEY, J., 1996. Gene expression under water deficit in loblolly pine (Pinus taeda L.): Isolation and characterization of cDNA clones. Physiol. Plant. 97, 139–148.
- CHAVES, M. M., 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. J. Exp. Botany. 42, 1-16
- CHEIKH, N. & BRENNER, M. L., 1992. Regulation of Key Enzymes of Sucrose Biosynthesis in Soybean Leaves'. Effect of Dark and Light Conditions and Role of Gibberellins and Abscisic Acid. Plant Physiol. 100, 1230-1237
- CHEN, T. M., BROWN, R.H. & BLACK, C. C., 1970. CO2 compensation concentration, rate of photosynthesis, and carbonic anhydrase activity of plants. Weed Sci. 18: 399-403.
- CHOUREY, P. S.; TALIERCIO, E. W.; CARLSON, S. J. & RUAN, Y. L., 1998. Genetic evidence that the two isoenzymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. Mol. Gen. Genetic. 259: 88-96.
- CHRISTOU, A.; MANTRANGOU, C.; YUPSANIS, T., 1998. Similarities and differences in the properties of alfalfa endonucleases. J Plant Physiol 153: 16–24
- ÇAKIR, B.; AGASSE, A.; GAILLARD, C.; SAUMONNEAU, A.; DELROT, S. & ATANASSOVA, R., 2003. A Grape ASR Protein Involved in Sugar and Abscisic Acid Signaling. Plant Cell, Vol. 15, 2165–2180.
- CAMPBELL, J. A.; DAVIES, G. J.; BULONE, V. & HENRISSAT, B., 1997. A classification of nucleotidediphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 326, 929– 939.
- CHOLLET, R., VIDAL, J.; O_LEARY, M. H., 1996. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47 273–298.
- CIVELLO, P. M.; POWELL, A. L. T.; SABEHAT, A.; BENNETT, A. B., 1999. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. Plant Physiol 121: 1273–1279
- COEN, E. S. & MEYEROWITZ, E. M., 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. Nature 353, 31-37.
- CORBESIER, L., VINCENT, C., JANG, S., et al, 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of arabidopsis. Science 316: 1030–1033.
- COSTA, M. A.; COLLINS, R. E.; ANTEROLA, A. M.; COCHRANE, F. C.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G., 2003.
- COUTINHO, P.; DELEURY, E.; DAVIES, G. J.; HENRISSAT, B., 2003. An evolving heirarchical family classification for glycosyltransferases. J Mol Biol 328: 307–317
- CHUCK, G.; LINCOLN, C. & HAKE, S., 1996. KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in Arabidopsis. Plant Cell 8, 1277–1289.
- COLE, D. J.; EDWARDS, R., 2000. In Metabolism of Agrochemicals in Plants, ed Roberts TR (Wiley, Chichester, UK), pp 107–154.
- COLLET, C. E.; HARBERD, N. P. & LEYSER, O., 2000. Hormonal interactions in the control of Arabidopsis hypocotyls elongation. Plant Physiology, Rockville, v. 124, p. 553-562.
- COLLINGE, M. & BOLLER, T. 2001. Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by Phytophthora infestans and to wounding. Plant Molecular Biology 46, 521-529.
- CONSONNI, G, et al, 2006. Nucleic Acids Research, Vol. 20, No. 2 373

COSGROVE, D. J., 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. Nature 407: 321-326

COSGROVE, D. J., 1993. New Phytol. 124, 1-23.

COSGROVE, D. J., 1993. Plant Physiol. 102, 1-6.

- COSGROVE, D. J., 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. Annual Review of Cell and Developmental Biology 13, 171–201. [CrossRef] [Web of Science] [Medline]
- COSGROVE, D. J.; BEDINGER, P.; DURACHKO, D. M., 1997. Group I allergens of grass pollen as cell wallloosening agents. Proc Natl Acad Sci USA 94: 6559–6564
- COSTA, M. A. P. DE C.; CARMO, D. O.; SOUZA, F. V. D.; MAGALHAES, G. L. DE.; HANSEN, D. DE S., 2004. Efeito de diferentes concentrações de GA3 no alongamento de brotações in vitro de jenipapo (Genipa americana). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., Anais... Belém.
- COUTURE, R.M., 1982. PP333: a new experimental plant growth regulator from ICI. Proc Plant Growth Regu Soc Am 9: 59
- CUMINO, A.; CURATTI, L.; GIARROCCO, L.; & SALERNO, G. L., 2002. Sucrose metabolism: Anabaena sucrose-phosphate synthase and sucrose-phosphate phosphatase define minimal functional domains shuffled during evolution. FEBS Lett. 517: 19–23.
- CURATTI, L.; FOLCO, E.; DESPLATS, P.; ABRATTI, G.; LIMONES, V.; HERRERA-ESTRELLA, L. & SALERNO, G., 1998. Sucrose-phosphate synthase from Synechocystis sp. strain PCC 6803: Identification of the spsAgene and characterization of the enzyme expressed in Escherichia coli. J. Bacteriol. 180: 6776–6779.
- CUTLER, A. J. & KROCHKO, J. E., 1999. Formation and breakdown of ABA. Trends in Plant Science. 4, 472-478.
- DAHAB, A. M. A.; ELDABH, R. S.; SALEM, M. A., 1987. Effect of gibberellic acid on growth, flowering and constituents of Chrysanthemum frutescens. Acta Horticulturae, 205: 129-135
- DaMATTA, F. M.; MAESTRI, M. & BARROS, R. S., 1997. Photosynthetic performance of two coffee species under drought. Photosynthetica. 34, 257-264.
- DANGL, J. L. & JONES, J. D. G., 2001. Nature 411, 826-833.
- DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A. & RICHBERG, M. H., 1996. Plant Cell 8, 1793–1807.
- DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A. & THOMAS, H., 2000. in Biochemistry and Molecular Biology of Plants, eds. Buchanan, B., Gruissem, W. & Jones, R. (ASPP Press, Rockville, MD), pp. 1044–1100.
- DANIELS, M. J.; MIRKOV, T. E.; CHRISPEELS, M. J., 1994. The plasma membrane of Arabidopsis thaliana contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. Plant Physiol106: 1325-1333.
- DANILEVSKAYA, O. N.; MENG, X.; HOU, Z; ANANIEV, E. V.; SIMMONS, C.R., 2008. A genomic and expression compendium of the expanded PEBP gene family from maize. Plant Physiology 146: 250–264.
- DAVIES, C.; BOSS, P. K. & ROBINSON, S. P., 1997. Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. Plant Physioly., Kobenhavn. V. 115, p.1155-1161.
- DAVIES, P. J., 1995. Plant Hormones: Physiology, biochemistry an molecular biology. Boston: Kluewer Academic Publishers, 833 p.
- DAVIES, P. J., 1995. Plant Hormones: Physiology, biochemistry an molecular biology. Boston: Kluewer Academic Publishers, 833 p.
- DE JARDIN, A.; SOKOLOV, L. N.; KLECZKOWSKI, L. A., 1999. Sugar/osmoticum levels modulate differential ABA-independent expression of two stressresponsive sucrose synthase genes in Arabidopsis, Biochem. J. 344, 503–509.
- DEAN, M. & ALLIKMETS, R., 1995. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. Curr. Opin. Genet. Dev. 5:779–785.

- DEL CARDAYRE, S. B. & RAINES, R. T., 1994. Strutural determination of enzymatic processitivy. Bioch. 33: 6031-6037
- DELGADO, R. R.; CASAMAYOR, J. L.; RODRIGUEZ, R. & CRUZ, R. F. R., 1986. Paclobutrazol effects on oranges under tropical conditions. Acta Hort., v.179, p.537-543.
- DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R. A. & LAMB, C., 1998. Nature 394, 585-588.
- DELLEDONNE, M.; ZEIER, J.; MAROCCO, A. & LAMB, C., 2001. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 13454–13459.
- DELMER, D. P.; STONE, B.A., 1988. Biosynthesis of plant cell walls, in: P.K. Stumpf, E.E. Conn (Eds.), The Biochemistry of Plants, vol. 14, Academic Press, San Diego, pp. 373–420.
- DEMEULEMEETER, M. A. C.; VOET, A. S. & DE PROFT, M. P., 1995. Induction of stem elongation on in vitro chicory root explants under unfavourable photoperiodic conditions by gibberellin A3. Plant Growth Regulation, 16:239-241.
- DEMMIG-ADAMS, B., 1990. Biochim. Biophys. Acta 1020, 1-24
- DESPLAN, C.; THEIS, J. & O'FARRELL, P.H., 1988. The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. Cell 54, 1081–1090.
- DIMROTH, P. 1997. Primary sodium ion translocating enzymes. Biochim. Biophys. Acta 1318:11-51. 21.
- M. J., and R. KOLTER., 1993. ABC transporters: bacterial exporters. Microbiol. Rev. 57:995-1017.
- DOEHLERT, D. C., 1990. Distribution of enzyme activities within the developing maize (Zea mays) kernel in relation to starch, oil and protein accumulation. Plant Physiol. 78: 561-567.
- DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; WEIJERS, D.; LECHNER, E.; YAMADA, M.; HOBBIE, L.; EHRISMANN, J. S.; JÜRGENS, G.; ESTELLE, M., 2005. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. Dev Cell. 9:109-19.
- DHARMAWARDHANA, D. P.; ELLIS, B. E.; CARLSON, J. E., 1995. A b-glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. Plant Physiol 107: 331–339
- DILL, A.; THOMAS, S. G.; HU, J.; STEBER, C. M. & SUN, T., 2004. The Arabidopsis F-Box Protein SLEEPY1 Targets Gibberellin Signaling Repressors for Gibberellin-Induced Degradation. The Plant Cell, Vol. 16, 1392–1405.
- DONG, Q.; ROY, L.; FREELING, M.; WALBOT, V. & BRENDEL, V., 2003. ZmDB, an integrated database for maize genome research. Nucleic Acids Research 31: 244-247
- DONNICI, C. L. & AUGUSTI R.; FERREIRA V. F.; SOUZA M. C. B. V. DE; FERREIRA M. L. G. & CUNHA A. C. & MELO J. O. F., 2006. 1,2,3-Triazolic heterocycles: history, preparations, applications and pharmacological Activities.Quim. Nova, Vol. 29, No. 3, 569-579
- DREYFUSS, G.; SWANSON, M. S. & PINOL-ROMA, S., 1988. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. Trends Biochem Sci 13, 86–91
- DUBOUZET, J. G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y; KASUGA, M.; DUBOUZET, E. G.; MIURA, S., SEKI, M.; SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2003. Plant J. 33, 751–763
- DUVAL, M.; HSIEH, T. F.; KIM, S. Y. & THOMAS, T. L., 2002. Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. Plant Mol. Biol. 50, 237-248.
- EFIFANIO, R. DE A. & PINTO, A. P., 1989. Estratégias na síntese de giberelinas. Química Nova. 12(4):356-373.
- EIMERT, K.; VILLAND, P.; KILIAN, A.; KLECZKOWSKI, L. A., 1996. Cloning and characterization of several cDNAs for UDP-glucose pyrophosphorylase from barley (Hordeum vulgare) tissues, Gene 170 227–232.
- ELBEIN, A. D.; PAN, Y. T.; PASTUSZAK, I.; CARROLL, D., 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology 13: 17R–27R

- ELIADY, A. A., SALAMA, M. I.; EL-SAMMAK, A.; ABOU EL-KHASHAB, A. M., 1992. Salt-tolerant of Baladi guava seedlings as affected by culture and ethrel. J Agric Res Tanta Univ 18:373–381
- EL-SAHHAR, K. F.; FOUAD, M.K.; FAHMI, R. & RIAD, F., 1984. Effect of gibberellic acid (GA3) on some botanical and chemical characteristics of basil (Ocimum basilicum L.). Annals of Agricultural Science (Cairo), 29(1): 401-414.
- EPPLE, P.; MACK, A. A.; MORRIS, V. R. F. & DANGL, J. L., 2003. Antagonistic control of oxidative stressinduced cell death in Arabidopsis by two related, plant-specific zinc finger proteins. PNAS May 27, 2003 vol. 100 no. 11 6831–6836
- ERNST, H. A.; OLSEN, A. N.; SKRIVER, K.; LARSEN, S. AND LO LEGGIO, L., 2004. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of plant specific transcription factors. EMBO Rep. 5, 297-303.
- EVERSON, R. G. & SLACK, C. R., 1968. Distribution of carbonic anhydrase in relation to the C4 pathway of photosynthesis. Phytochemistiy 7: 581-584.
- EVERSON, R. G. 1970. Carbonic anhydrase and CO2 fixation in isolated chloroplasts. Phytochemistry 9: 25-32.
- EWING, R. M.; KAHLA, A. B.; POIROT, O.; LOPEZ, F.; AUDIC, S. & CLAVERIE, J. M., 1999. Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. Genome Research 9: 950-959
- EULGEM, T.; RUSHTON, P. J.; ROBATZEK, S. & SOMSSICH, I.E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends Plant Sci. 5: 199–206.
- FALK, A. & RASK, L., 1995. Expression of a zeatin-O-glucoside-degrading b-glucosidase in Brassica napus. Plant Physiol 108: 1369–1377
- FARMER E. E., RYAN C. A., 1990. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. Proc Natl Acad Sci USA. 87: 7713-7716.
- FARMER E. E.; RYAN C.A., 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of woundinducible proteinase inhibitors. Plant Cell 4: 129-134.
- FLECK, B. & HARBERD, N. P., 2002. Evidence that the Arabidopsis nuclear gibberellin signalling protein GAI is not destabilised by gibberellins. The Plant Journal. 32, 935–947
- FABIO FORNARA, F. et al, 2004. Plant Physiology, August, Vol. 135, pp. 2207–2219
- FANUTTI, C.; GIDLEY, M. J. & REID, J. S. G., 1993. Action of a pure xiloglucan ando-transglycosylase (formerly called xiloglucan-specific endo-(1,4)-beta-D-glucanase) from the cotyledons of germinated nasturtion seeds. Plant J. 3: 691-700.
- FAURE, S.; HIGGINS, J.; TURNER, A.; LAURIE, D. A., 2007. The FLOWERING LOCUS T-like gene family in barley (Hordeum vulgare). Genetics 176: 599–609.
- FELLER, G., THIRY, M., GERDAY, C., 1991. Nucleotide sequence of the lipase gene lip2 from the antarctic psychrotroph Moraxella TA144 and site-specific mutagenesis of the conserved serine and histidine residues. DNA Cell Biol. 10 381-8
- FEYS, B. J. & PARKER, J. E., 2000. Trends Genet. 16, 449–455.
- FINKELSTEIN, R. R. & GIBSON, S. I., 2001. ABA and sugar interactions regulating development: Cross-talk or voices in a crowd? Curr. Opin. Plant Biol. 5, 26–32.
- FLETCHER, R; HOFSTRA, G., 1988. Triazol as potential plant protectants. In: Berg D, Plempel M (eds) Sterol synthesis inhibitors in plant protection. Ellis Horwood Ltd, Cambridge, pp 321–331
- FORNALÉ, S. et al, 2006. Plant Mol Biol (2006) 62:809-823
- FOSKET, D. E., 1994. Plant growth and development: a molecular approach. San Diego: Academic Press, 580p.
- FOSTER, T.; KIRK, C.; JONES, W. T.; ALLAN, A. C.; ESPLEY, R.; KARUNAIRETNAM, S. & RAKONJAC, J. 2007. Characterisation of the DELLA subfamily in apple (Malus x domestica Borkh.). Tree Genet Genomes 3:187–197

- FRANK, H. A.; CUA, A.; CHYNWAT, V.; YOUNG, A.; GOSZTOLA, D. & WASIELEWSKI, M. R., 1994. Photosynth. Res. 41, 389–395
- FROGER, A.; TALLUR, B.; THOMAS, D. & DELAMARCHE, C., 1998. Prediction of functional residues in water channels and related proteins. Prorein Science, 71458-1468.
- FU, X. & HARBERD, N. P., 2003. Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. Nature 421: 740–743.
- FU, X. D.; RICHARDS, D. E.; FLECK, B; XIE, D.X., BURTON, N.; HARBERD, N. P., 2004. The Arabidopsis mutant sleepy1(gar2-1) protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF SLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. Plant Cell 16:1406–1418
- FU, X.; RICHARDS, D. E., AIT-ALI, T.; HYNES, L. W.; OUGHAM, H.; PENG, J.& HARBERD, N. P., 2002. Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. Plant Cell 14: 3191–3200
- FUJIOKA, S.; YAMANE, H., SPRAY, C. R.; KATSUMI, M.; PHINNEY, B.O.; GASKIN, P.; MACMILLAN, J. & TAKAHASHI, N., 1988. The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant (D8) of maize accumulates native gibberellins. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 9031–9035.
- GALLAGHER, J. A.; CAIRNS, A. J. & POLLOCK, C. J. 2004. Cloning and characterization of putative fructosyltransferase and two putative invertase genes from the temperate grass Lolium temulentum L. J. Exp. Bot. 55: 557-569.
- GAN, S.; AMASINO, R.M., 1997. Making sense of senescence. Plant Physiol 113: 313-319
- GARCIA-MARTÍNEZ, L. J & HEDDEN, P., 1997. Gibberellins and fruit development. In: TOMÁZ-BARBERÁN, F. A. & ROBINS, R. J., ed. Phytochemistry of Fruit and Vegetables. New York: Oxford University Press Inc: 263-285.
- GARDINER, J. C.; TAYLOR, N. G. & TURNER, S. R., 2003. Control of cellulose synthase complex localization in developing xylem. Plant Cell 15: 1740-1748.
- GAZZARRINI, S. & MCCOURT, P., 2001. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. Curr. Opin. Plant Biol. 4, 387–391.
- GEIGENBERGER, P.; LANGENBERGER, S.; WILKE, I.; HEINEKE, D.; HELDT, H. W. & STITT, M., 1993. Sucrose is metabolized by sucrose synthase and glycolysis within the phloem complex of Ricinus communis L. seedlings. Planta 190: 446-453.
- GEORGE, E. F., 1993. Plant propagation by tissue culture: part. 1, the technology. 2. ed. Edington: Exegectis, 574 p.
- GIAQUINTA, R. T., 1980. Translocation of sucrose and oligosaccharides. In: Preiss J (ed) The Biochemistry of Plants 3. New York: Academic Press, pp 271–300
- GIBSON, P. R.; TARLING, C. A.; ROBERTS, S.; WITHERS, S. G. & DAVIES, G. J., 2004. The Donor Subsite of Trehalose-6-phosphate Synthase. BINARY COMPLEXES WITH UDP-GLUCOSE AND UDP-2-DEOXY-2-FLUORO-GLUCOSE AT 2 Å RESOLUTION. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 279, No. 3, Issue of Jnauary 16, pp. 1950–1955.
- GIBSON, S. I., 2004. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network, J. Exp. Bot. 55, pp. 253–264. View Record in Scopus | Cited By in Scopus (75)
- GIBSON, S. I., 2005, Control of plant development and gene expression by sugar signaling, Curr. Opin. Plant Biol. 8, pp. 93–102. Article | PDF (186 K) | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (120)
- GIBSON, S. J., 2000. Plant sugar-response pathways: Part of a complex regulatory web. Plant Physiol. 124, 1532–1539.
- GILFORD, J. M. D. & REES, A. R., 1973. Growth of the tulip shoot. Sci Hort 1:143-156
- GITE, S.; SHANKAR, V., 1995. Single-strand-specific nucleases. Crit Rev Microbiol 21: 101–122

- GITE, S; SHANKAR, V., 1992 Characterization of S1 nuclease: involvement of carboxylate groups in metal binding. Eur J Biochem 210: 437–441
- GLERMAN, N.; ROLLAS, S.; KIRAZ, M.; EKINCI, A. C. & VIDIN, A., 1997. Farmaco, 52, 691–695.
- GRAHAM, I. A., 2002. Trehalose- 6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation. Plant J 29: 225–235.
- GODDIJN, O. J. M.; VERWOERD, T. C.; VOOGD, E.; KRUTWAGEN RWHH; DE GRAAF PTHM; POELS, J.; VAN DUN, K.; PONSTEIN, A. S.; DAMM, B.; PEN, J., 1997. Inhibition of thehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. Plant Physiol 113: 181–190
- GOLDSMITH, I. R.; HOOD, K. A.; MACMILLAN, J., 1983. Inhibition of gibberellins biosynthesis in Gibberella fujikuroi by PP3j3. Paper presented at an SCI symposium on ergosterol biosynthesis inhibitors, Reading, UK, March 20-24
- GOMEZ, E.; ROYO, J.; MUNIZ, L. M.; SELLAM, O.; PAUL. W.; GERENTES, D.; BARRERO, C; LOPEZ, M.; PEREZ, P.; HUEROS, G., 2009. The Maize Transcription Factor Myb-Related Protein-1 Is a Key Regulator of the Differentiation of Transfer Cells. Source: PLANT CELL Volume: 21 Issue: 7 Pages: 2022-2035.
- GOMEZ, J., SFINCHEZ-MARTINEZ, D.; STIEFEL, V.; RIGAU, J.; PUIGDOMONECH, P. & PAGOS, M., 1988. A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. Nature 334: 262-264.
- GORDON, A. J.; MINCHIN, F. R.; JAMES, C. L. & KOMINA, O., 1999. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. Plant Physiol. 120: 867-878.
- GORIN, M. B.; YANCEY, S. B.; CLINE, J.; REVEL, J. P.; HORWITZ, J., 1984. The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: Characterization and structure based on cDNA cloning. Cell 39:49-59.
- GRAEBE, J. E., 1982. Gibberellin biosynthesis in cell-free system from higher plants. In PF Wareing, ed, Plant Growth Substances. Academic Press, London, pp 7 1-80
- GRAEBE, J. E., 1987. Annu. Rev. Plant Physiol. 38, 419-465.
- GRAHAI, D., C. ATKINS, A.; REED, M. L.; PATrERSON, B. D. & M.SMILLIE, R., 1971. Carbonic anhydrase, photosynthesis and light-induced pHchanges. In: M. D. Hatch, C. B. Osmond and R. 0. Slatyer, eds. Photosynthesis and Photorespiration. Wiley Interscience, N.Y. pp. 267-274.
- GRAHAM, D. & REED, M. L., 1971. Carbonic anhydrase and the regulation of photosynthesis. Nature New Biol. 231: 81-82.
- GREEEN, B. R. & DURNFORD, D. G., 1996. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47:685-714
- GREVE, K.; LA COUR, T.; JENSEN, M.K.; POULSEN, F.M. & SKRIVER, K., 2003. Interactions between plant RING-H2 and plant-specific NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) proteins: RING-H2 molecular specificity and cellular localization, Biochem J. 371, pp. 97–108. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (27)
- GRIFFITH, J. K.; BAKER, M. E.; ROUCH, D. A.; PAGE, M. G. P.; SKURRAY, R. A.; PAULSEN, I. T.; CHATER, K. F.; BALDWIN, S. A. & HENDERSON, P. J. F., 1992. Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. Curr. Opin. Cell Biol. 4:684–695.
- GRIFFITHS, S.; DUNFORD, R. P.; COUPLAND, G.; LAURIE, D. A., 2003. The evolution of CONSTANSlike gene families in barley, rice, and arabidopsis. Plant Physiology 131: 1855–1867.
- GRIMES, H. D.; KOETJE, D. S., FRANSCESHI, V. R., 1992. Expression, activity, and cellular accumulation of methyl jasmonate-responsive lipoxygenase in soybean seedlings. Plant Physiol. 100: 433-443.
- GROSPIETSCH, M.; LIPAVSKÁ, H. & OPATRNÁM J., 2000. Effect of paclobutrazol on soluble sugars and starch content of de novo regenerating potato stem explants. Biologia Plantarum 43(1):137-139.

GROVE, J. F. & MULHOLLAND, T. P. C., 1960. J. Chem. Soc. 3007.

- GUARDIA, M.D. de la & BENLLOCH, M., 1980. Effects of potassium and gibberellic acid on stem growth of whole sunflower plants. Physiologia Plantarum, 49:443-448.
- GUBLER, F.; CHANDLER, P.; WHITE, R.; LLEWELLYN, D. & JACOBSEN, J. 2002. GA signaling in barley aleurone cells: Control of SLN1 and GAMYB expression. Plant Physiol. 129: 191–200.
- GUILFOYLE, T.; HAGEN, G.; ULMASOV, T.; MURFETT, J., 1998. How does auxin turn on genes? Plant Physiol. 118:341-7.
- GEHRING, W. J., 2004. Homeoboxes in the study of development. Science 236, 1245–1252.
- GIBSON, R. P.; TURKENBURG, J. P.; CHARNOCK, S. J.; LLOYD, R. & DAVIES, G. J., 2002. Insights into trehalose synthesis provided by the structure of the retaining glycosyltransferase OtsA. Chem. Biol. V9: 1337–1346.
- GONZALEZ, D. H.; ANDREO, C. S., 1989. Trends Biochem. Sci. 14 24-27.
- HABERER, G.; KIEBER, J. J., 2002. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. Plant Physiol 128: 354–362
- HAIGLER, C. H.; IVANOVA-DATCHEVA, M.; HOGAN, P. S.; SALNIKOV, V. V.; HWANG, S.; MARTIN, K. & DELMER, D. P., 2001. Carbon partitioning to cellulose synthesis. Plant Mol. Biol. 47: 29-51.
- HAJIHASHEMI, S. H.; KIAROSTAMI, K. H.; ENTESHARI, S. H. & SABOORA, A., 2009. Effect of Paclobutrazol on Wheat Salt Tolerance at Pollination Stage. RUSSIAN JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY Vol. 56 No. 2.
- HAJIHASHEMI, S.; KIAROSTAMI, K.; SABOORA, A. & ENTESHARI, S., 2007. Exogenously applied paclobutrazol modulates growth in salt-stressed wheat plants. Plant Growth Regul (2007) 53:117–128
- HATCH, M. D & SLACK, C. R., 1966. Photosynthesis in sugarcane leaves: a new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. Biochem J. 101: 103–111.
- HEDDEN, P. & PHILLIPS, A. L. 2000. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. Trends Plant Sci. 5: 523–530.
- HORCAJADA, C.; GUINOVART, J. J.; FITA, I. & FERRER, J. C., 2006. Crystal structure of an archaeal glycogen synthase: Insights into oligomerization and substrate binding of eukaryotic glycogen synthases. J. Biol. Chem. 281: 2923–2931.
- H. JOHANSSON et al, 2002. Biochimica et Biophysica Acta 1576, 53–58 57
- HAHLBROCK, K. & SCHEEL, D., 1989. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40, 347-369.
- HALDRUP, A.; NAVER, H. & SCHELLER, H. V., 1999. The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic Arabidopsis plants lacking the PSI-N subunit of photosystem I. The Plant Journal (1999) 17(6), 689–698
- HALFORD, N. G.; HEY, S.; JHURREEA, D.; LAURIE, S.; MCKIBBIN, R. S.; ZHANG, Y. & PAUL, M.; HIGHLY, J., 2004. Conserved protein kinases involved in the regulation of carbon and amino acid metabolism, J. Exp. Bot. 55, pp. 35–42. View Record in Scopus | Cited By in Scopus (25)
- HALFORD, N. G.; HEY, S.; JHURREEA, D.; LAURIE, S.; MCKIBBIN, R. S.; PAUL, M. & ZHANG, Y., 2003., Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase, J. Exp. Bot. 54, pp. 467–475. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (58)
- HAMMOND, J.P.; BROADLEY, M.R.; WHITE, P.J., 2004, Genetic responses to phosphorus deficiency. Ann. Bot. 94:323-332.
- HANSON, K. R. & HAVIR, E. A., 1978. RecentAdv. Phytochem. 12, 91-137.
- HAO, D.; YAMASAKI, K.; SARAI, A. & OHME-TAKAGI, M., 2002. Biochemistry 41, 4202–4208
- HARE, P. D.; CRESS, W. A. & Van STADEN, J., 1998. Plant stress adaptations making metabolism move. Curr. Opin. Plant Biol. 1, 267-274

- HARTY, A. R. & STADEN, V.J. Paclobutrazol and temperature effects on lemon.In: International Citrus Congress, 6., 1988. Proceedings...International Society of Citriculture, 1988. p.343-353.
- HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K. & BONHERT, H. J., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol. 51, 463-499
- HASSAN, A. & CHAUDHRY, N.Y., 2004. Effects of growth hormones i.e., GA3 and Kinetin and Heavy metal i.e., Pb(NO3)2 on the seedlings of Cucumis sativus L. Pakistan Journal of Biological Sciences, 7(8): 1453-1462.
- HE, W. Z. & MALKIN, R., 1992. Specific release of 9-kDa extrinsic polypeptide of photosystem I from spinach chloroplasts by salt washing. FEBS Lett. 308, 298–300.
- HE, X. Z.; WANG, X. Q.; DIXON, R. A., 2006. J Biol Chem 281:34441-34447.
- HEIM, U.; WEBER, H.; BAUMLEIN, H. & WOBUS, U., 1993. A sucrose synthase gene of Vicia faba L.: expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. Planta 191: 394-401.
- HEMPEL, J.; PEROZICH, J.; ROMOVACEK, H.; HINICH, A.; KUO, I.; FEINGOLD, D.S., 1994. UDPglucose dehydrogenase from bovine liver—primary structure and relationship to other dehydrogenases, Protein Sci. 3. 1074–1080.
- HENDERSON, P. J. F. & MAIDEN, M. C. J., 1990. Homologous sugar transport proteins in Escherichia coli and their relatives in both prokaryotes and eukaryotes. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B 326:391–410.
- HENDERSON, P. J. F., 1991. Sugar transport proteins. Curr. Opin. Struct. Biol.1:590-601.
- HENDRIX, P.; TUROWSKI, P.; MAYER-JAEKEL, R. E.; GORIS, J.; HOFSTEENGE, J.; MERLEVEDE, W.; HEMMINGS, B. A., 1993b. Analysis of subunit isoforms in protein phosphatase 2A holoenzymes from rabbit and Xenopus. J Biol Chem 268: 7330–7337.
- HIGGINS, C. F., 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. Annu. Rev. Cell Biol. 8:67–113.
- HIRT, H., 2002. A new blueprint for plant pathogen resistance. Nat. Biotechnol. 20, pp. 450-451.
- HITE, D.; OUTLAW, W. H. JR. & TARCZYNSKI, M. C., 1993. Elevated levels of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase in Vicia guard cells indicate cell-specific carbohydrate interconversions. Plant Physiol. 101: 1217–1221.
- HO, LC., 1988 Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Bio 39:355–378
- HOAD, G. V.; LOVEYS, B. R. & SKENE, G. M., 1977. The effect of fruit removal on cytokinins and gibberellin-like substances. Planta 136: 25-30
- HONG, S. H.; KIM, I. J.; YANG, D. C. & CHUNG, W. I. I., 2002. Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from Cucumis melo. J. Exp. Bot. 53, 2271–2272.
- HOTTIGER, T. V. DE; HALL, C.; BOLLER, M. N. & WIEMKEN, A., 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeas. II. Physiological concentrations of trehalose increase ghe thermal stability of proteins in vitro. Eur. J. Biochem. 219:187-193.
- HUBER, J. L.; HUBER, S. C. & NIELSEN, T. H., 1989. Protein phosphorylation as a mechanism for regulation of spinach leaf sucrosephosphate synthase activity. Arch. Biochem. Biophys. 270: 681–690.
- HUBER, S. C. & AKAZAWA, T., 1986. A novel sucrose synthase pathway for sucrose degradation in cultered Sycamore cells. Plant Physiol. 81: 1008-1013.
- HUSSAIN, A. & PENG, J., 2003. DELLA proteins and GA signaling in Arabidopsis. J. Plant Growth Regul. 22: 134–140

HUTCHISON, M.; GASKIN, P.; MacMILLAN, J. & PHINNEY, B. O., 1988. Phytochemistry: 27, 2695.

IKEDA, A.; UEGUCHI-TANAKA, M.; SONODA, Y.; KITANO, H.; KOSHIOKA, M.; FUTSUHARA, Y.; MATSUOKA, M.& YAMAGICHI, J., 2001. Slender rice, a constitutive gibberellins response mutant, is

caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. Plant Cell 13:999–1010.

- IRAN, L.S.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SIMPSON, S.D.; MARUYAMA, K.; FUJITA, Y.; SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., 2007. Co-expression of the stressinducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis, Plant J. 49, pp. 46–63. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (14)
- ISKANDAR, H. M.; SIMPSON, R. S.; CASU, R. E.; BONNETT, G. D.; MACLEAN, D. J. & MANNERS, J. M., 2004. Comparison of Reference Genes for Quantitative Real-Time.
- ITOH, H.; UEGUCHI-TANAKA, M.; SATO, Y.; ASHIKARI, M.. & MATSUOKA, M. 2002. The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. Plant Cell 14: 57–70.
- IWASAKI, Y.; FUJISAWA, Y.& KATO, H., 2003. Function of heterotrimeric G protein in gibberellin signaling. J. Plant Growth Regul. 22: 126–133.
- IUSEM, N. D.; BARTHOLOMEW, D. M.; HITZ, W. D. & SCOLNIK, P.A., 1993. Tomato (Lycopersicon esculentum) transcript induced by water deficit and ripening. Plant Physiol. 102, 1353–1354.
- JAN, A.; YANG, G.; NAKAMURA, H.; ICHIKAWA, H.; KITANO, H.; MATSUOKA, M.; MATSUMOTO, H.; KOMATSU, S., 2004. Characterization of a xyloglucan endotransglucosylase gene that is up-regulated by gibberellin in rice. Plant Physiology 136, 3670–3681
- JUANG, H. H., 2004. Modulation of iron on mitochondrial aconitase expression in human prostatic carcinoma cells. Mol. Cell. Biochem. 265 185-94.
- JANG, J. C.; LEON, P.; ZHOU, L.; SHEEN, J., 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. Plant Cell 9: 5–19
- JANSSON, S., ANDERSEN, B.; SCHELLER, H.V., 1996. Nearestneighbour analysis of higher-plant photosystem I holocomplex. Plant Physiol. 12, 409–420.
- JAYNES, T, A.; NELSON, O. E., 1971. Invertase activity in normal and mutant maize endosperms during development. Plant Physiol 47:623-628
- JEANNEAU, M.; GERENTES, D.; FOUEILLASSAR, X.; ZIVY, M.; VIDAL, J.; TOPPAN, A. & PEREZ, P., 2002. Improvement of drought tolerance in maize: Towards the functional validation of the ZM-ASR1 gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. Biochimie 84,1127–1135.
- JEFFERY, C. J., 1999. Moonlighting proteins. Trends Biochem. Sci. 24 8-11.
- JI X, ENDE, W. V. D.; LAERE, A. V.; CHENG, S. & BENNETT, J. 2005. Structure, evolution and expression of two invertase gene families of rice. J. Mol. Evol. 60: 615-634.
- JMO, E.; MAYAK, S.; THOMPSON, J. E.; DUMBROFF, E. B., 1986. Senescence in cut carnation flowers: temporal and physiological relationships among water status, ethylene, abscisic acid and membrane permeability. Physiol Plant 68: 323–328
- JOGL, G., ROZOVSKY, S.; MCDERMOTT, A. E., TONG, L., 2003. Optimal alignment for enzymatic proton transfer: structure of the Michaelis complex of triosephosphate isomerase at 1.2-A resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 50-5.
- JOHN, G.; MARSHALL, & ERWIN, B.; DUMBROFF, 1999. Turgor Regulation via Cell Wall Adjustment in White Spruce. Plant Physiology, Vol. 119, pp. 313–319
- JOHN, I. et al., 1997. Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. Plant Molecular Biology 33, 641-651.
- JOHNSON, D.S., 2009 Triazole sprays induce diffuse browning disorder in 'Cox's Orange Pippin' apples in controlled atmosphere storage. Postharvest Biology and Tecnology. V. 52: 2 (202-206).

- JOHNSON, G. L. & LAPADAT, R., 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science 298, pp. 1911–1912. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (1102)
- JONAK, C.; OKRESZ, L.; BOGRE, L. & HIRT, H., 2002. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. Curr. Opin. Plant Biol. 5, pp. 415–424. Article | PDF (106 K) | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (155)
- JONES, M. M.; OSMOND, C. B. & TURNER, N. C., 1980. Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficits. Aust J Plant Physiol 7: 193–205
- JONHANSSON, I.; KARLSSON, M.; JOHANSON, U.; LARSSON, C. & KJELBOM, P., 2000. The roles of aquaporins in cellular and whole plant water balance. Biochim. Biophys. Acta. 1465, 324-342.
- JONHASEN, B. O., 1997. In situ PCR on Plant Material with Sub-cell Resolution. Annals of Botany 80:697-700.
- JOOS, H. J.; HAHLBROCK, K., 1992. Phenylalanine ammonia-lyase in potato (Solanum tuberosum L.). Genomic complexity, structural comparison of two selected genes and modes of expression. Eur J Biochem. 204:621-9.
- KALLARACKAL, J.; ORLICH, G.; SCHOBERT, C. & KOMOR, E., 1989. Sucrose transport into phloem of Ricinus communis L. Seedlings as measured by the analysis of sieve tube sap. Planta 177:327–335
- KAMALAVALLI, D, PRATHAPASENAN G, RAO R, PATHAK CH., 1972. Metabolic changes during germination of cotton and sorghum and the role of gibberellic acid. Biochem J 128:55
- KAMELI, A. & LOSEL, D. M., 1993. Carbohydrates and water status in wheat plants under water stress. New Phytol 125:609–614
- KAMIYA, Y.; TAKAHASHI, N. & GRAEBE, J. E., 1986. Planta 169, 524-528.
- KAUFMAN, P. B; GHOSHEH, N. S.; LACROIX, J.D; et al., 1973. REGULATION OF INVERTASE LEVELS IN AVENA STEM SEGMENTS BY GIBBERELLIC-ACID, SUCROSE, GLUCOSE, AND FRUCTOSE. PLANT PHYSIOLOGY Vol.52(3):221-228.
- KAUFMAN, P. B, GHOSHEH, N. S; IKUMA, H., 1969. IN-VIVO TURNOVER OF INVERTASE IN AVENA STEM SEGMENTS TREATED WITH GA3 AND SUCROSE. PLANT PHYSIOLOGY Vol. S 44, 36-& Supplement: Suppl. S
- KAUFMAN, P. B.; GHOSHEH, N. S.; LEE, M.; CARLSON, T. J.; JONES, J. D.; RIGOT, W.; BIGELOW, W.C.; KRAUS, S. & MOORE, P. H., 1981. Effect of gibberellic acid on silica content and distribuition in sugarcane. Plant Physiol. 68, 314-317.
- KAUR, S,; GUPTA, A. K. & KAUR, N., 1998. Gibberelin A3 reverses the effect of salt stress in chickpea (Cicer arietinum L.) seedlings by enhancing amylase activity and mobilization of starch in cotyledons. Plant Growth Regulation 26: 85–90
- KELLER, E; COSGROVE, D. J., 1995. Expansins in growing tomato leaves. Plant J 8: 795-802
- KEPINSKI, S.; LEYSER O., 2005. Plant development: auxin in loops. Curr Biol.15: 208-10.
- KIKUCHI, K. et al, 2000. Molecular analysis of the NAC gene family in rice. Molecular and General Genetics 262, 1047-1051.
- KING, L. S.; AGRE, P. 1996. Pathophysiology of the aquaporin water channels. Annu Rev Physiol 58:619-648.
- KING, R. W.; MORITZ, T.; EVANS, L. T., et al, 2006. Regulation of flowering in the long-day grass Lolium temulentum by gibberellins and the FLOWERING LOCUS T gene. Plant Physiology 141: 498–507.
- KLECZKOWSKI, L. A., 1994. Glucose activation and metabolism through UDPglucose pyrophosphorylase in plants, Phytochemistry 37, 1507–1515.
- KLIEBENSTEIN, D. J.; DIETRICH, R. A.; MARTIN, A. C.; LAST, R. L. & DANGL, J. L., 1999. Mol. Plant Microbe Interact. 12, 1022–1026
- KNOETZEL, J. & SIMPSON, D. J., 1993. The primary structure of PsaN, encoding an extrinsic lumenal polypeptide of photosystem I. Plant Mol. Biol. 22, 337–345.
- KNOWLES, J. R., 1991. Enzyme catalysis: not different, just better. Nature 350 121-4.
- KO, J. H., YANG, S. H., & HAN, K. H., 2006. Upregulation of an Arabidopsis RING-H2 gene, XERICO, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. Plant J. 47: 343–355.
- KOCH, K. E. & ZENG, Y. 2002. Molecular approaches to altered C partitioning: genes for sucrose metabolism. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127: 474-483. Lee HS and Sturm A. 1996. Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. Plant Physiol. 112: 1513-1522.
- KOCH, K. E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 509-540.
- KOCH, K. E.; NOLTE, K. D.; DUKE, E. R.; MCCARTY, D. R. & AVIGNE, W. T., 1992. Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. Plant Cell 4: 59-69.
- KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C. H.; KOCHABA, M., 1974. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberelic acid and adenine sulphate. Annals of Botany, London, v. 38, p. 795-802.
- KOCK, K. E., 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47:509–540
- KOJIMA, S.; TAKAHASHI, Y.; KOBAYASHI, Y., et al, 2002. Hd3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. Plant and Cell Physiology 43: 1096–1105.
- KOMATSU, A.; MORIGUCHI, T.; KOYAMA, K.; OMURA, M. & AKIHAMA, T., 2002. Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. J. Exp. Bot. 53: 61-71.
- KON-DO, K., CHIBA, H. & KAWAI, F., 1952. Plant carbonic anhydrase. III. Some properties of plant carbonic anhydrase. Bull. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. No. 8. pp. 28-35.
- KOORNNEEF, M. & VAN DER VEEN, J. H., 1980. Induction and analysis of gibberellin-sensitive mutants in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Theor. Appl. Gen. 58: 257–263.
- KOORNNEEF, M., ELGERSMA, A.; HANHART, C.J.; VAN LOENEN-MARTINET, E. P.; VAN RIGN, L. & ZEEVAART, J. A. D., 1985. A gibberellin insensitive mutant of Arabidopsis thaliana. Physiol. Plant. 65: 33–39.
- KOORNNEEF, M., HANHART, C. J. & VAN DER VEEN, J.H. 1991. A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in Arabidopsis thaliana. Mol. Gen. Genet. 229: 57–66.
- KOSHIOKA, M.; PHARIS, R. P. & MOORE, P. H., 1984. Identification of Gibberellins A4 and A36 in Sugarcane Apices by Gas Chromatography-Selected Ion Monitoring. Agric. Biol. Chem., 48(9): 2395-2396.
- KOSTER, K. L., 1991. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiol 96: 302–304
- KRAFT, E.; STONE, S. L.; MA, L.; SU, N.; GAO, Y.; LAU, O.S., DENG, X.W., & CALLIS, J. 2005. Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of Arabidopsis. Plant Physiol. 139: 1597–1611.
- KRIEDEMANN, P. & BEEVERS, H., 1967. Sugar uptake and translocation in castor bean seedlings. I. Characteristics of transfer in intact and excised seedlings. Plant Physiol 42: 161–173
- KUAN, G.; DASSA, E.; SAURIN, W.; HOFNUNG, M. & SAIER, M. H. JR, 1995. Phylogenetic analyses of the ATP-binding constituents of bacterial extracytoplasmic receptor-dependent ABC-type nutrient uptake permeases. Res. Microbiol. 146:271–278.
- KUBO, A.; ARAI, Y.; NAGASHIMA, S.; YOSHIKAWA, T., 2004. Alteration of sugar donor specificities of plant glycosyltransferases by a single point mutation. Arch Biochem Biophys 429: 198–203.
- KUBO, A.; ARAI, Y.; NAGASHIMA, S.; YOSHIKAWA, T., 2004. Arch Biochem Biophys 429:198–203.

- KUHNLE, J. A.; MOORE, P. H.; HADDON, W. F. & FITCH, M. M., 1983. Identification of gibberellins from sugarcane plants. J. Plant Growth Regul. 2:59-71.
- KULIGOWSKA, E.; KLARKOWSKA, D.; SZARKOWSKI, J. W., 1988. Purification and properties of endonuclease from wheat chloroplasts, specific for single-stranded DNA. Phytochemistry 27: 1275–1279
- KUMAR, D.; MUKHERJEE, S.; REDDY, M. K.; TEWAKI, K. K., 1995. A novel single-stranded DNA-specific endonuclease from pea chloroplasts. J Exp Bot 46: 767–776
- LAMBRECHTS, H; KOLLOFFEL, C., 1993. Soluble and insoluble invertase activity in elongating Tulipa gesneriana flower stalks. Physiol Plant 89:830–834
- KING, K., MORITZ, T., & HARBERD, N. 2001. Gibberellins are not required for normal stem growth in Arabidopsis thaliana in the absence of GAI and RGA. Genetics 159: 767–776.
- KRANZ, H. D., ET AL. 1998. Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from Arabidopsis thaliana. Plant J. 16: 263–276.
- LEE, Y.; CHOI, D. & KENDE, H., 2001. Expansins: ever-expanding numbers and functions. Plant Biology. Vol.4(6): 527-532
- LEPINIEC, L.; VIDAL, J.; CHOLLET, R.; GADAL, P.; CRETIN, C., 1994. Plant Sci. 99. 111-124.
- LI, X.; GILMORE, A. M.; CAFFARRI, S.; BASSI, R.; GOLAN, T.; KRAMER, D. & NIYOGI, K. K., 2004. Regulation of Photosynthetic Light Harvesting Involves Intrathylakoid Lumen pH Sensing by the PsbS Protein. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 279, No. 22, Issue of May 28, pp. 22866–22874
- LAMBRECHTS, H; ROOK, F.; KOLLOFFEL, C., 1994. Carbohydrate status of tulip bulbs during cold-induced flower stalk elongation and flowering. Plant Physiol 104:515–520
- LANGE, T.; HEDDEN, P. & GRAEBE, J. E., 1994. Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 91, pp. 8552-8556.
- LATORRE, K. A.; HARRIS, D. M.; RUNDLE, S. J., 1997. Differential expression of three Arabidopsis genes encoding the B_regulatory subunit of protein phosphatase 2A. Eur J Biochem 245: 156–163.
- LATZKO, E.; KELLY, G. J., 1983. Physiol. Veg. 21 805-815.
- LEAH, R.; KIGEL, J.; SVENDSEN, I. & MUNDY, J., 1995. Biochemical and molecular characterization of a barley seed betaglucosidase. J. Biol. Chem. 270, 15789–15797.
- LEBHERZ, H. G.; LEADBETTER, M. M.; BRADSHAW, R. A., 1984. Isolation and characterization of cytosolic and chloroplastic forms of spinach leaf fructose diphosphate aldolase. J Biol Chem 259:1011–1017
- LEE, H. I.; LEÓN, J.; RASKIN, I., 1995. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. Proc Natl Acad Sci U S A.92: 4076-9.
- LEE, M. H.; YANG, C. C.; WANG, H. L. & LEE, P. D., 2003. Regulation of sucrose phosphate synthase of the sweet potato callus is related to illumination and osmotic stress. Bot. Bull. Acad. Sin. 44: 257–265.
- LEE, S.; CHENG, H.; KING, K.E.; WANG, W.; HE, Y.; HUSSAIN, A.; LO, J.; HARBERD, N.P. & PENG, J. 2002. Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. Genes Dev. 16: 646–658.
- LENTON, J. R., HEDDEN, P. & GALE. M. D., 1987. Gibberellin insensitivity and depletion in wheat consequences for development. In Hormone action in plant development: A critical appraisal (ed. G.V. Hoad, J.R. Lenton, M.B. Jackson, and R.K. Atkin), pp. 145–160. Butterworths, London, UK.
- LETCHER, R.A.; GILLEY, A.; SANKLA, N. & DAVIS, T.D. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. Horticultural Reviews, v.24, p.55-138, 2000.
- LEVITT, J., (1986) Recovery of turgor by wilted, excised cabbage leaves in the absence of water uptake. Plant Physiol 82: 147–153

- LI, Z. C.; DURACHKO, D. M.; COSGROVE, D. J., 1993. An oat coleoptiles wall protein that induces wall extension in vitro and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. Planta 191: 349–356
- LIGTERINK, W., & HIRT, H., 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: versatile signaling tools. Int. Rev. Cytol. 201, pp. 209–275. Abstract | Article | PDF (1080 K)
- LIN, Q.; BUCKLER, E. S.; MUSE, S. V.; WALKER, J. C., 1999. Molecular evolution of type 1 serine/threonine protein phosphatases.Mol Phylogenet Evol 12: 57–66.
- LINK, B. M.; COSGROVE, D. J., 1998. Acid-growth response and a-expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco. Plant Physiol 118: 907–916
- LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. & SHINOZAKI, K. 1998. Plant Cell 10, 1391–1406
- LIU, X. & BAIRD, W., 2003. Differencial expression of genes regulated in response to drought or salinity stress in sunflower. Crop Science. 43, 678-687.
- LJUNG, K.; OSTIN, A.; LIOUSSANNE, L.; SANDBERG, G., 2001. Developmental regulation of indole-3acetic acid turnover in Scots pine seedlings. Plant Physiol 125: 464–475
- LOCKHART, J. A., 1965. An analysis of irreversible plant cell elongation. J Theor Biol 8: 264–275
- LOESCHER, W. & EVERARD J., 1996. Sugar alcohol metabolism in sinks and sources. In: Zamski E, Schaffer AA (eds) Photoassimilate distribution in plant and crops: source- Sink Relationships. Marcel Dekker, New York, pp 185–207
- LOHMAN, N.K.; GAN, S.; JOHN, M. C.; AMASINO, R. M., 1994. Molecular analysis of natural leaf senescence in Arabidopsis thaliana. Physiol Plant 92: 322–328
- LORETI, E; GUGLIELMINETTI, L.; YAMAGUCHI, J. & GONZALI, S., 1998. Effect of anoxia on gibberellic acid-induced protease and alfa-amylase processing in barley seeds. J. Plant Physol., Jena, V. 152, p.44-50.
- MacMILLAN, J.& PRYCE, R. J., 1973. Phytochemistry, ed. Miller, P., Van Nostrand-Reinhold, New Jersey. Vol. 3, p. 283.
- MAHMOUD, S. E. D. M., 1996. Response of growth and essential oil content of sweet basil (Ocimum basilicum L.) to some natural hormones. Acta Horticulturae, 426: 629-634.
- MAIDEN, M. C. J.; DAVIS, E. O.; BALDWIN, S. A.; MOORE, D. C. M. & HENDERSON, P. J. F., 1987. Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. Nature 325:641–643.
- MALONEY, P. C., 1990. Microbes and membrane biology. FEMS Microbiol. Rev. 87:91–102.
- MALONEY, P. C., 1992. The molecular and cell biology of anion transport by bacteria. Bioessays 14:757–762.
- MARGER, M. D. & M. H. SAIER, JR, 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators catalyzing uniport, symport and antiport. Trends Biochem.
- MARINEZ, G.; CHAVES, A. R. & ANON, M. C., 1996. Effect of Exogenous Application of Gibberellic Acid on color Chage and Phenylalanine Ammonia-lyase, Chlorophyllase and Peroxidase Activities during Ripening of Strawberry Fruit. J. Plant Growth Regul., New York, v. 15, p: 139-146.
- MARTIN, J.; STORGAARD, M.; ANDERSEN, C. H.; NIELSEN, K. K., 2004. Photoperiodic regulation of flowering in perennial ryegrass involving a CONSTANS-like homolog. Plant Molecular Biology 56: 159–169.
- MARTIN, T.; FROMME, E. W. B.; SALANOUBAT, M. & WILLMITZER, L., 1993. Expression of an Arabidopsis sucrose synthase gene indicates a role in metabolisation of sucrose both during phloem loading and sink organs. Plant J. 4: 367-377.
- MARTINE, M., MICELI, F., MORGAN, J.A., SCALET, M., AND ZEBRI, G., 1993. Synthesis of Osmotically Active Substrates in Winter Wheat Leaves and Related Drought Resistance of Different Genotypes, J. Agric. Crop. Sci., vol. 177, pp. 176–184.

- MASKIN, L.; GUBESBLAT, G. E.; MORENO, J.E.; CARRARI, F. O.; FRANKEL, N.; SAMBADE, A.; ROSSI, M. & IUSEM, N. D., 2001. Differential expression of the members of the Asr gene family in tomato (Lycopersicon esculentum). Plant Sci. 161, 739–746.
- MATSUOKA, M., 2003. Gibberellin signaling: How do plant cells respond to GA signals? J. Plant Growth Regul. 22: 123–125.
- MATSUOKA, M.; ICHIKAWA, H.; SAITO, A.; TADA, Y.; FUJIMURA, T. & KANO-MURAKAMI, Y., 1993. Expression of a rice homeobox gene causes altered morphology of transgenic plants. Plant Cell 5, 1039–1048.
- MAUREL, C.; REIZERJ, SCHROEDER, J. I.; CHRISPEELSM, J., 1993. The vacuolar membrane protein y-TIP creates water specific channels in Xenopus oocytes. EMBO J 12:2241-2247.
- MBEGUIE-A-MBEGUIE, D.; GOMEZ, R. M. & FILS-LYCAON, B., 1997. Molecular cloning and nucleotide sequence of a protein from apricot fruit (accession No. U82760) homologous to LEC14B protein isolated from Lithospermum gene expression during fruit ripening (PGR 97–161). Plant Physiol. 115, 1288.
- MCDOWELL, J. M. & DANGL, J. L., 2000. Trends Biochem. Sci. 25, 79-82.
- MCQUEEN-MASON, S. 1996. Plant cell walls and the control of growth. Biochemical Society Transactions 25, 204–214.
- MEDINA, J.; BARGUES, M.; TEROL, J.; PEREZ-ALONSO, M. & SALINAS, J., 1999. Plant Physiol. 119, 463–470
- MEEK, S.; MORRICE, N.; MACKINTOSH, C., 1999. Microcystin affinity purification of plant protein phosphatases: PP1C, Protein Phosphatase 2A B_ Regulatory Subunit Family in Plants Plant Physiol. Vol. 129, 2002 821 PP5 and a regulatory A-subunit of PP2A. FEBS Lett 457: 494–498.
- MELO, J. T.; RIBEIRO, J. F.; LIMA, V. L. G. F., 1979. Germinação de sementes de algumas espécies arbóreas nativas do Cerrado. Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v.1, p.8-12.
- MÉTRAUX, JEAN-PIERRE., 1987. Gibberellins and plant cell elongation. In: DAVIES, P.J. ed. Plant hormones and their role in plant growth and development. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, p. 296-317.
- METZGER, J. D., 1985. Role of gibberellins in the environmental control of stem elongation in Thlapsi arvense Plant Physiol 78: 8-13
- MEYER, R. F. & BOYER, J. S., 1981. Osmoregulation, solute distribution and growth in soybean seedlings having low water potentials. Planta 151: 482–489
- MILLER, T.; MUSLIN, E.; DORWEILER, J., 2008. A maize CONSTANS-like gene, conz1, exhibits distinct diurnal expression patterns in varied photoperiods.Planta 227: 1377–1388.
- MINCHIN, P. E. H.& THORPE, M. R., 1993. SINK STRENGTH A MISNOMER, AND BEST FORGOTTEN. PLANT CELL AND ENVIRONMENT Vol.16(9):1039-1040
- MISRA, M., 1995. The effect of gibberellic acid (GA3) on the growth, photosynthetic pigment content and oil yield of patchouli (Pogostemon cablin Benth.) plants grown in shade condition. Acta Physiologiae Plantarum, 17(4): 367-370.
- MITA, S.; SUZUKI-FUJII, K. & NAKAMURA, K., 1995. Sugar-inducible expression of a gene for _-amylase in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol. 107, 895–904.
- MIYAMOTO, K. & KAMISAKA, S., 1990. Effect of gibberellic acid in epicotyl growth and carbohydrate distribution in derooted Pisum sativum cuttings with or without cotyledons. Physiol Plant 80: 357–364
- MONKO, M.; KULIGOWSKA, E.; SZARKOWSKI, J. W., 1994. A single-strandspecific nuclease from a fraction of wheat chloroplast stromal protein. Phytochemistry 37: 301–305
- MOORE, P. H., 1995. Temporal e spatial regulation of sucrose accumulation in the sugarcane stem. Austr J Plant Physiol. 22:661-679.

- MOORE, P. H. & GINOZA, H., 1980. Gibberellin studies with sugarcane. III. Effects of rate and frequency of gibberellic acid applications on stalk lengh and fresh weigth. Crop Science. P.78-82
- MOORE, P. H. & OSGOOD, V. R., 1979. Pro-GIBB, Gibberellic acid, Growth regulators, Gibberellin, GA3. Exp. Station HSPA, p.1-3
- MOORE, P. H., 1977a. Effect of gibberellic acid on sugarcane yields. Hawaiin Sugar Technologist Rep 36: 67-73.
- MOORE, P. H., 1977b. Use of gibberellic acid to increase sugarcane yields in Hawaiin. Plant Growth Reg. Work. Group.p. 173-180.
- MOORE, P. H.; OSGOOD, R. V.; CARR, J. B. & GINOZA, H., 1982. Sugarcane studies with gibberellins. V. Plot harversts vs stalk harvests to assess the effect of applied GA3 on sucrose yield. J. Plant Growth Regul. 1:205-210.
- MOORE, P.H., 1980. Additive and nonadditive effects of serial applications of gibberellic acid on sugarcane internode growth. Physiol. Plant. 49, 271-276.
- MOREL, J.-B. & DANGL, J. L., 1997 Cell Death Diff. 19, 17-24.
- MORRIS, D. A. & ARTHUR, E. D., 1985. Effects of gibberellic acid on patterns of carbohydrate distribution and acid invertase activity in Phaseolus vulgaris. Physiol Plant 65:257–262
- MORTENSON, E. & DREYFUSS, G., 1989. RNP in maize protein.Nature 337: 312.
- MS, K; CHO, D.; LI, X.; JIAO, D. M.; PINTO, M.; MIYAO, M.; MATSUOKA, M., 2001. Introduction of genes encoding C4 photosynthesis enzymes into rice plants: physiological consequences. : Novartis Found Symp. 2001;236:100-11; discussion 111-6.
- MUMBY, M. C.; WALTER, G., 1993. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. Physiol Rev 73: 673–699.
- MUNNS, R.; BRADY, C. J. & BARLOW, E. W. R., 1979. Solute accumulation in the apex and leaves of wheat during water stress. Aust J Plant Physiol 6: 379–389
- MARSH, J. J.; LEBHERZ, H. G., 1992. Fructose-bisphosphate aldolases: an evolutionary history. Trends Biochem. Sci. 17 110-3.
- MEHOUACHI, J.; TADEO, F. R.; ZARAGOZA, S.; PRIMO MILLO, E. & TALON, M., 1996. Effects of gibberellic acid and paclobutrazol on growth and carbohidrate accumulation in shoots and roots of citrus rootstock seedlings. Journal of Horticultural Science, v.71 (5):747-754.
- MITCHELL, P., 1967. Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: natural fuel cells and solar cells. Fed. Proc. 26: 1370–1379.
- MITCHELL, P., 1967. Translocations through natural membranes. Adv. Enzymol. 29:33-87.
- NIEMEYER, H., 1988. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae. Phytochemistry 11: 3349–3358
- NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z. K.; SAKUMA, Y.; SEKI, M., MIURA, S.; SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., 2000. Plant Mol. Biol. 42, 657–665
- NASEEM, I.; HADI, S.M., 1987. Single-strand-specific nuclease of pea seeds: glycoprotein nature and associated nucleotidase activity. Arch Biochem Biophys 255: 437–445
- NAYLOR, A. W., 1984. Hormonal regulation of development. II. The function of hormones from the level of the cell to whole plant. In: Scot TK (ed) Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 10. Berlin: Springer Verlag, pp 180–185
- NICOLOSO, F.T. ET AL., 2003. Efeito de concentrações e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen) cultivadas in vitro. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.27, n.1, p.84-90.
- NIMMO, H. G., 2000. Trends Plant Sci. 5 75-80.

- NISHIMURA, A.; TAMAOKI, M.; SAKAMOTO, T. & MATSUOKA, M., 2000. Over-expression of tobacco knotted1-type class 1 homeobox genes alters various leaf morphology. Plant Cell Physiol. 41, 583–590.
- NISHITANI, K., 1995. Endo-xyloglucan transferase, a new class of transferase involved in cell wall construction. J. Plant Res. 108: 2105-2117.
- NISHITANI, K.; TOMINAGA, R. 1991. In vitro molecular weight increase in xyloglucan by an apoplastic enzyme preparation from epicotyls of Vigna angularis. Physiologia Plantarum 82, 490–497.
- NOLTE, K. D. & KOCK. K. E., 1993. Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. Plant Physiol. 101: 899-905.
- Oh SA, Lee SY, Chung IK, Lee CH, Nam HG (1996) A senescenceassociated gene of Arabidopsis thaliana is distinctively regulated during natural and artificial induced leaf senescence. Plant Mol Biol 30: 739–754
- O_LEARY, M. H., 1982. Annu. Rev. Plant Physiol. 33 297-315.
- OGATA, T.; UEDA, Y.; SHIOZAKI, S.; HORIUCHI, S. & KAWASE, K., 1995. Effects of gibberellin synthesis inhibitors on flower settings of Satsuma mandarin. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, v.64, p.251-259.
- OGAWA, M.; KUSANO, T.; KATSUMI M, SANO H, 2000. Rice gibberellininsensitive gene homolog, OsGAI encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. Gene 245:21–29
- OH, M. H.; ROMANOW, W. G.; SMITH, R. C.; ZAMSKI. E.; SASSE, J. & CLOUSE, S. D., 1998. Soyben BRU1 encodes a functional xyloglucan endotransglycosylase that is highly expressed in inner epicotyl tissues during brassinosteroid–promoted elongation. Plant Cell Physiol. 39: 124-130.
- OHL, S.; HEDRICK, S. A.; CHORY, J.; LAMB, C. J., 1990. Functional properties of a phenylalanine ammonialyase promoter from Arabidopsis. Plant Cell. 2:837-48.
- OKAZAWA, K.; SATO, Y.; NAKAGAWA, T.; ASADA, K.; KATO, I.; TOMITA, E. & NISHITANI, K., 1993. Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in the plant cell walls. J. Biol. Chem. 268: 25364-25328.
- OLSON, A. L. & PESSIN, J. E., 1996. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. Annu. Rev. Nutr. 16:235–256.
- OLSZEWSKI, N.; SUN, T.-P.& GUBLER, F., 2002. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. Plant Cell 14: S61–80.
- OPARKA, KJ., 1990. What is phloem unloading? Plant Physiol 94:393-396
- ORZAEZ, D.; GRANELL, A., 1997. DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in Pisum sativum. Plant J 11:137–144
- OTTING, G.; QIAN, Y.Q.; BILLETER, M.; MULLER, M.; AFFOLTER, M.; GEHRING, W. J. & WUTHRICH, K., 1990. Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. EMBO J. 9, 3085–3092.
- PADMANABHAN, V.; DIAS, D. M. A. L. & NEWTON, R. J., 1997. Expression analysis of a gene family in a loblolly pine (Pinus taeda L.) induced by water deficit stress. Plant Mol. Biol. 35, 801–807.
- PAO, S. S.; PAULSEN, I. T. & SAIER, M. H. JR, 1998. Major Facilitator Superfamily. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, Mar. 1998, p. 1–34.
- PAQUETTE, S.; MOLLER, B. L. & BAK, S., 2003. On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. Phytochemistry 62, 399–413
- PARKER, J., 1972. Protoplasmic resistance to water deficits. In:Kozlowski TT (ed) Water Deficits and Plant Growth, Vol. 3. New York/London: Academic Press, pp 125–176
- PATIL, P. S.; KALLURAYAB, C B. & DHARMAPRAKASHC, S. M., 2008. 4-[(E)-2-Furylmethyleneamino]-3-phenyl-1H-1,2,4-triazole-5(4H)-thione. Acta Cryst.. E64, o1528–o1529

- PAULSEN, I. T.; SLIWINSKI, M. K. & SAIER, M. H. JR. MICROBIAL genome analyses: Global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. J. Mol. Biol., in press.
- PAULSEN, J. D., 1995. Chorophyll a/b binding proteins. Photochem. Photobiol. 62:367-382
- PE'REZ-CALLEJO'N, E.; CASAMAYOR, A.; PUJOL, G.; CAMPS, M.; FERRER, A.; ARIN⁻O, J., 1998. Molecular cloning and characterization of two phosphatase 2A catalytic subunit genes from Arabidopsis thaliana. Gene 209: 105–112.
- PEAR, J. R.; KAWAGOE, Y.; SCHERCKENGOST, W. E.; DELMER, D. P. & STALKER, D. M., 1996. Higher plants contain homologs of the bacterial celA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 93, pp. 12637-12642,
- PEGO, J. V.; KORTSTEE, A. J.; HUIJSER, C.; SMEEKENS, S. C., 2000. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. J Exp Bot 51: 407–416
- PENG, J. & HARBERD, N. P., 1997. Gibberellin deficiency and response mutations suppress the stem elongation phenotype of phytochromedeficient mutants of Arabidopsis. Plant Physiol. 113: 1051–1058.
- PENG, J. & HARBERD, N. P., 1993. Derivative alleles of the Arabidopsis gibberellin-insensitive (gai) mutation confer a wildtype phenotype. Plant Cell 5: 351–360.
- PENG, J., CAROL, P. ; RICHARDS, D. E.; KATHRYN, E. K.; COWLING, R. J.; MURPHY, G. P. & HARBERD. N. P., 1997. The Arabidopsis GAI gene defines. a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. GENES & DEVELOPMENT 11:3194–3205
- PENG, J.; CAROL, P.; RICHARDS, D.E.; KING, K.E.; COWLING, R.J.; MURPHY, G.P. & HARBERD, N. P., 1997. The Arabidopsis GAI gene defines a signalling pathway that negativel
- PENG, J.; RICHARDS, D. E.; HARTLEY, N. M. ET AL. 1999a. Green Revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. Nature, 400, 256–261.
- PERHAM, R. N., 1990. The fructose-1,6-bisphosphate aldolases: same reaction, different enzymes. Biochem. Soc. Trans. 18 185-7.
- PERSANS, M. W.; WANG, J.; SCHULER, M. A., 2001. Characterization of maize cytochrome P450 monooxygenases induced in response to safeners and bacterial pathogens. Plant Physiol 125: 1126–1138
- PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de & ALLOUFA, M. A. I., 2001. IN VITRO GERMINATION OF MANGABEIRA (Hancornia speciosa Gomez) IN DIFFERENTS CULTURA MEDIA. Rev. Bras. Frutic. vol.23, n.2. Jaboticabal
- PORCHIA, A. C. & SALERNO, G. L., 1996. Sucrose biosynthesis in a prokaryotic organism: Presence of two sucrose-phosphate synthases in Anabaena with remarkable differences compared with the plant enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13600–13604.
- POTTER, I.; FRY, S.C., 1994. Changes in xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity during hormoneinduced growth in lettuce and cucumber hypocotyls and spinach cell suspension cultures. Journal of Experimental Botany 45, 1703–1710.
- POTTER, T. I.; ZANEWICH, K.P. & ROOD, S.B., 1993. Gibberellin physiology of sanflower: endogenous gibberellins and response to gibberellic acid. Plant Growth Regulation, 12:133-140.
- POULTON, J.E., 1990. Cyanogenesis in plants. Plant Physiol. 94, 401-405.
- PRAXEDES, S. C.; DaMATTA, F. M.; LOUREIRO, M. E.; FERRÃO, M. A. G. & CORDEIRO, A. T., 2006. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (Coffee canephora Pierre var. Kouillou). leaves. Environmental and Exp. Botany. 56, 263-273.
- PREVIEW ADAMS R. P.; KENDALL E.; KARTHA, K. K., 1990. Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of Selaginella lepidophylla. Biochem Syst Ecol 18: 107–110

- PRITCHARD, J.; HETHERINGTON, P. R.; FRY, S. C. & THOMOS, A. D., 1993. Xyloglucan endotransglycosylase activity, microfibril orientation and the profiles of cell wall properties along growing regions of maize roots. J. Exp. Bot. 265: 1281-1289.
- PROSEUS, T. E.; ZHU, G. L.; BOYER, J. S., 2000. Turgor, temperature and the growth of plant cells: using Chara corallina as a model system. J Exp Bot 51: 1481–94
- PYSH, L. D., WYSOCKA-DILLER, J. W., CAMILLERI, C., BOUCHEZ, D. & BENFEY, P. N., 1999. The GRAS gene family in Arabidopsis: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROWLIKE genes. Plant J. 18: 111–119.
- PYSH, L. D.; WYSOCKA-DILLER, J. W.; CAMILLERI, C.; BOUCHEZ, D., BENFEY, P. N., 1999. The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. Plant J. 18 111-9
- QIN, X. & ZEEVAART, J. A., 1999. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of ABA biosynthesis in water-stressed bean. Proceedings. National Academy Science. USA. 96, 15354-15361.
- QISHEN, P.; HAYS, J. B.; RAJAGOPAL, I. & SCHAEFER, T. S., 1993. Selection f Arabidopsis cDNAs that partially correct phenotypes of Escherichia coli DNA-damage-sensitive mutants and analysis of two plant cDNAs that appear to express UV-specific dark repari activities. Plant Molecular Biology. Volume 22, Number 3. Pages411-426
- QUINLAN, J.D., PJ RICHARDSON, 1984. Effect of paclobutrazol (PP333) on apple shoot growth. Acta Hortic 146: 105-1 10
- RADCHUK, R.; RADCHUK, V.; WESCHKE, W.; BORISJUK, L. & WEBER, H., 2006.Repressing the expression of the sucrose nonfermenting-1-related protein kinase gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype, Plant Physiol. 140, pp. 263–278. View Record in Scopus | Cited By in Scopus (23)
- RAMOS, L. S. & CARVALHO, A., 1997. Shoot and root evaluations on seedlings from Coffee genotypes. Bragantia. 56. 59-68.
- RAYMOND, J.; BANDZIULIS, SWANSON, M. S. & x DREYFUSS, M. S., 1989. REVIEW RNA-binding proteins as developmental regulators. Genes Dev. 1989 3: 431-437.
- RAZAL, R. A.; ELLIS, S.; SINGH, S.; LEWIS, N. G.; TOWERS, G. H. N., 1996. Nitrogen recycling in phenylpropanoid metabolism. Phytochemistry. 41: 31-35.
- REBERS, M, VERMEER E, KNEGT E, SHELTON CJ, VAN DER PLAS LHW., 1995. Gibberellin levels and cold-induced floral stalk elongation in tulip. Physiol Plant 94:687–691
- REED, J. W., 2001. Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. Trends Plant Sci. 6:420-25.
- REIZER, J.; REIZER, A.; SAIER, M. H. JR, 1993. The MIP family of integral membrane channel proteins: Sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. Crif Rev Biochem Mol 28:235-257.
- REN, T.; QU, F. & MORRIS, T.J., 2000. HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to Turnip crinkle virus, Plant Cell 12, pp. 1917–1926. Full Text via CrossRef
- RICARD, B.; TOAI, T. V.; CHOUREY, P. & SAGLIO, P., 1998. Evidence for the critical role of sucrose synthase for anoxic tolerance of maize roots using a double mutant. Plant Physiol. 116: 1323-1331.
- RICCARDI, F.; GAZEAU, P.; DE VIENNE, D. & ZIVY, M., 1998. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Plant Physiol. 117, 1253–1263.
- RIOU-KHAMLICHI, C.; HUNTLEY, R.; JACQMARD, A. & MURRAY, J. A., 1999. Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. Science 283, 1541–1544.

- ROBERTSON, M., 2004.Two transcription factors are negative regulators of gibberellin response in the HvSPY-signaling pathway in barley aleurone, Plant Physiol. 136, pp. 2747–2761. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (20)
- ROCK, C. D., 2000. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. New Phytol. 148, 357-396
- RODRI'GUEZ PL, 1998. Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. Plant Mol Biol 38: 919–927.
- RODRIGUES, J. A., 1995. FISIOLOGIA DA CANA-DE-AÇÚCAR. Ed. Universit. BOTUCATU SP. 101 p.
- ROLLAS, S.; KALYONCUOGLU, N.; SUR-ALTINER, D. & YEGENOGLU, Y., 1993. Pharmazie, 48, 308-309
- RONCHI, C. P.; CATEN, A. T.; MORAES, G. A. B. K.; BATISTA, K. D.; CHAVES, A. R. M. & DaMATTA, F. M., 2005. Efeitos de taxas de imposição e severidade do déficit hídrico sobre o metabolismo de carboidratos em folhas de Coffee canephora. In: III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Embrapa Café, Brasília (extended abstract on CD-ROM).
- ROOD, S. B.; MANDEL, R. & PHANS, R. P., 1989. Endogenous Gibberellins and Shoot Growth and Development in Brassica napus. Plant Physiol. (89):269-273
- ROOK, F.; CORKE, F.; CARD, R.; MUNZ, G.; SMITH, C. & BEVAN, M. W., 2001. Impaired sucroseinduction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. Plant J. 26, 421–433.
- ROOS, M. D. & HANOVER, J.A., 2000. Structure of O-linked GlcNAc transferase: Mediator of glycandependent signaling. Biochem. Biophys. Res. Commun. 271: 275–280.
- ROSS, J. J. 1994. Recent advances in the study of gibberellin mutants. Plant Growth Regul. 15: 193–206.
- ROSS, JJ, O'NEILL DP, SMITH JL, KERCKHOFFS HJ, ELLIOTT RC., 2000. Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. Plant J 21:547–552
- ROSSI, C.; CHERSI, A. & CORTIVO, M., 1969. Studies on carbonic anhydrase from spinach leaves: isolation and properties. In: R. E. Forster, J. T. Edsall, A. B. Otis and F. J. W. Houghton, eds. CO2: Chemical, Biochemical and Physiological Aspects. National Aeronautics and Space Administration, Washington D.C. pp. 131-138.
- ROWE, J. R., 1968. The common and systhematic nomenclature of cyclic diterpenes. 3 rev. Forest product laboratory, U.S. Dep. Agr., Madison, W.I.
- RUAN, Y. L.; LLEWELLYN, D. J. & FURBANK, R. T.; 2003. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation and seed development. Plant Cell 15: 952-964.
- RUBIO, V.; LINHARES, F.; SOLANO, R.; MARTIN, A.C.; IGLESIAS, J.; LEYVA, A.; PAZ-ARES, J., 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae.Genes Dev. 15:2122-2133.
- RUDOLPH, A. S.; CROWE, J. H. & CROWE, L. M., 1986. Effects of three stabilizing agents-proline, betaine and trehalose-on membrane phospholipids. Arch Biochem Biophys 245: 134–143
- RAZEM, F. A., EL-KEREAMY, A., ABRAMS, S. R., & HILL, R. D. 2006. The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. Nature 439: 290–294.
- ROSE, J. K. C.; LEE, H. H.; BENNETT, A. B., 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripeningregulated. Proc Natl Acad Sci USA 94: 5955–5960
- ROSE, J. K. C.; COSGROVE, D. J.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; BENNETT, A. B., 2000. Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny. Plant Physiol 123:1583–1592
- ROSSI, M. & IUSEM, N. D., 1994. Tomato (Lycopersicon esculentum) genomic clone homologous to a gene encoding an abscisic acidinduced protein. Plant Physiol. 104, 1073–1074.
- SABLOWSKI, R. W. M. & MEYEROWITZ, E. M., 1998. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. Cell 92, 93-103.

- SAURA-VALLS, M.; FAURÉ, R.; RAGAS, S.; PIENS, K.; BRUMER, H.; TEER, T. T.; COTTAZ, S.; DRIGUEZ, H. & PLANAS, A., 2006. Kinetic analysis using low-molecular mass xyloglucan oligosaccharides defines the catalytic mechanism of a Populus xyloglucan endotransglycosylase. Biochem. J. 395: 99-106.
- SCHAFFER, M R.; LANDGRAF, J.; PEREZ-AMADOR, M.; et al, 2000. Monitoring genome-wide expression in plants. CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY Volume: 11 Issue: 2 Pages: 162-167
- SCHELLER, H. V., NAVER, H. & MØLLER, B.L., 1997. Molecular aspects of photosystem I. Physiol. Plant. 100, 842–851.
- SCHUSTER, G. & GRUISSEM, W., 1991. Chloroplast mRNA- 3¢ end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. EMBO J 10, 1493–1502.
- SINGH, S.; Lewis, N. G.; Towers, G. H., 1998. Nitrogen recycling during phenylpropanoid metabolism in sweet potato tubers.J Plant Physiol. 1998.153:316-23.
- SNOWBALL, A.M.; WARRINGTON, I.J.; HALLIGAN, E.A. & MULLINS, M.G., 1994. Phase-change in citrus- the effects of main stem node number, branch habit and paclobutrazol application on flowering in citrus seedlings. Journal of Horticultural Science, v.69, p.149-160.
- SOMOGY, M., 1945. A new reagent for the determination of sugars. Journal Biological Chemistry. 160:61-63.
- Spray CR, Kobayashi M, Suzuki Y, Phinney BO, Gaskin P, MacMillan J. 1996. The dwarf-1 (dt) mutant of Zea mays blocks three steps in the gibberellin-biosynthetic pathway. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 93:10515–18
- SUDA, C. N. K. & GIORGINI, J. F., 2003. Multiple forms of endo-1,4-beya-glucanases in the endosperm of Euphorbia heterophylla L. J. Exp. Bot. 54: 2045-2052.
- SAAB, I. N.; SHARP, R. E.; PRITCHARD, J.; VOETBERG, G. S., 1990. Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. Plant Physiol 93: 1329–1336
- SAAB, I.; SHARP, R. E.; PRITCHARD, J.; VOETBERG, G. S., 1990. Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potencials. Plant Physiology. 93, 1329-1336
- SAEED, A.I.; SHAROV, V.; WHITE, J.; LI, J.; LIANG, W.; BHAGABATI, N.; BRAISTED, J.; KLAPA, M.; CURRIER, T.; THIAGARAJAN, M.; STURN, A.; SNUFFIN, M.; REZANTSEV, A.; POPOV, D.; RYLTSOV, A.; KOSTUKOVICH, E.; BORISOVSKY, I.; LIU, Z.; VINSAVICH, A.; TRUSH, V.& QUACKENBUSH, J., 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. Biotechniques 34(2):374-8.
- SAIER, M. H. JR, 1994. Computer-aided analysis of transport protein sequences: Gleaning evidence concerningf unction, structure, biogenesisa nd evolution. Microbio Rev 58:71-93.
- SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J. G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2002. Biochem. Biophys. Res. Commun. 290,998–1009
- SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K., 2002. Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. Funct. Integr. Genomics 2:282-291.
- SALAMA, MI, ELAIDY AA, EL-SAMMAK A, ABOU EL-KHASHAB AM., 1992. Leaf pigments and nutrient elements content of Roumi Red grape nursling as affected by salinity and some growth regulators. J Agric Res Tanta Univ 18:382–390
- SALNIKOV, V. V.; GRIMSON, M. J.; SEAGULL, R. W. & HAIGLER, C. H., 2003. Localization of sucrose synthase and callose a freeze-substituted secondary-wall-stage cotton fibers. Prot. 221: 175-184.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 417 p.

SANDERMANN, H., JR., 1992. Plant metabolism of xenobiotics. Trends Biochem. Sci. 17, 82-84.

- SANIEWSKI, M & DE MUNK, W.J., 1981. Hormonal control of shoot elongation in tulips. Sci Hortic 15:363– 372
- SANIEWSKI, M., 1989. The use of paclobutrazol, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, for study of hormonal control of tulip stem elongation. Bull Pol Acad Sci Biol Sci 37:1–3
- SANTARIUS, K. A., 1973. The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance. Planta 113: 105–114
- SANZ, A.; MARTINEZ, C. C.& GUARDIOLA, J. L., 1987. The effect of the fruit and exogenous hormones on leaf expansion and composition in citrus. J Exp Bot 38: 2033-2042
- SCHAFFER, W. E.; ROHWER, J. M. & BOTHA, F. C., 2004. Protein-level expression and localization of sucrose synthase in the sugarcane culm. Physiol. Plant 121: 187-195.
- SCHNEIDER, A.; SALAMINI, F. & GEBHARDT, C., 1997. Expression patterns and promoter activity of the coat-regulated gene ci21A of potato. Plant Physiol. 113, 335–345.
- SCHRADER, S. & SAUTER, J., 2002. Seasonal changes of sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase activities in poplar wood (Populus x canadensis Moench robusta) and their possible role in carbohydrate metabolism. J. Plant Physiol. 159: 833-843.
- SCHUBERT, W. D.; KLUKAS, O.; KRAUSS, N.; SAENGER, W.; FROMME, P. & WITT, H.T. 1997. Photosystem I of Synechococcus elongates at 4 Å resolution: comprehensive structure analysis. J. Mol. Biol. 272, 741–769.
- SCHUERMANN, J. P.; JIANG, J.; CUELLAR, J.; LLORCA, O.; WANG, L.; GIMENEZ, L. E.; JIN, S.; TAYLOR, A. B.; DEMELER, B.; MORANO, K. A.; HART, P. J.; VALPUESTA, J. M.; LAFER, E. M. & SOUSA, R., 2008. Structure of the Hsp110:Hsc70 Nucleotide Exchange Machine. Molecular Cell 31, 232–243
- SEHNKE, P.C. & FERL, R.J., 1995. Nucleotide sequence of an Arabidopsis thaliana cDNA clone (Accession no. U32176) encoding the complete precursor for a homolog to the barley extrinsic thylakoid lumenal polypeptide PSI-N (PGR 95–088). Plant Physiol. 109, 1126.
- SEITZ, K. & LANG, A., 1968. Invertase activity and cell growth in lentil epicotyls. PlantPhysiol 43: 1075–1082
- SELTH, L.A.; DOGRA, S. C.; RASHEED, M. S.; HEALY, H.; RANDLES, J.W. & REZAIAN, M. A., 2005. A NAC domain protein interacts with Tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication, Plant Cell 17, pp. 311–325. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (34)
- SENTOKU, N.; SATO, Y. & MATSUOKA, M., 2000. Overexpression of rice OSH genes induces ectopic shoots on leaf sheaths of transgenic rice plants. Dev. Biol. 220, 358–364.
- SEO, M. & KOSHIBA, T., 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. Trends Plant Science. 7,41-48
- SHARP, R. E.; WU, Y.; VOETBERG, G. S.; SAAB, I. N.; LENOBLE, M. E., 1994. Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. J Exp Bot 45: 1734–1751
- SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., 2000. Curr. Opin. Plant Biol. 3, 217-223
- SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. Curr. Opin. Plant Biol. 3, 217-223.

SHIRASU, K. & SCHULZE-LEFERT, P., 2000. Plant Mol. Biol. 44, 371–385.

SHIRASU, K.; NAKAJIMA, H.; RAJASEKHAR, V. K.; DIXON, R. A. & LAMB, C., 1997. Plant Cell 9, 261–270.

- SHOUB, J, DE HERTOGH AA., 1974. Effects of ancymidol and gibberellins A3 and A4+7 on Tulipa gesneriana L. cv. Paul Richter during development in the greenhouse. Sci Hortic 2:55–67
- SHUKLA, A. & FAROOQI, A. H. A., 1990. Utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. Current Research on Medicinal and Aromatic Plants, 12(3): 152-157.
- SHUKLA, A. & FAROOQI, A. H. A., 1999. Cumulation in spearmint (Mentha spicata). Photosynthetica, 36(4): 509-517.
- SILHAVY, D.; HUTVÁGNER, G.; BARTA, E. & BÁNFALVI, Z., 1995. Isolation and characterization of a water stress-inducible cDNA clone from Solanum chacoense. Plant Mol. Biol. 27, 587–595.
- SILVA, C.M.M.S.; FAY, E. F.; JONSSON, C.M., 2003. Paclobutrazol: regulador de crescimento vegetal. In: SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. Impacto ambiental do regulador de crescimento vegetal paclobutrazol. Jaguariúna, p. 11-16. (Documentos, 30).
- SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F.; VIEIRA, R. F., 2003. Degradação do paclobutrazol em solos tropicais. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 38, n. 10, p. 1223-1227.
- SILVA, C.M.M.S.; VIEIRA, R. F.; NICOLLELA, G., 2003. Paclobutrazol effects on soil microorganisms. Applied Soil Ecology, São Paulo, v.22, p. 79–86.
- SILVA, E. A. A. da., 2002. Coffee (Coffee arabica cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation. 2002. 105 f. Thesis (PhD) Wageningen University, Wageningen.
- SILVA, V. A., 2007. Caracterização fisiológica da tolerância à seca em coffea canephora: contribuição relativa do sistema radicular e da parte aérea. Lavras, Doutorado, 68p.
- SILVERSTONE, A. L.; JUNG, H.-S.; DILL, A.; KAWAIDE, H.; KAMIYA, Y. & SUN, T.-P., 2001. Repressing a Repressor. Gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. Plant Cell 13: 1555–1566.
- SILVERSTONE, A. L.;, MAK, P. Y. A.; MARTINEZ, E. C.& SUN, T.-P., 1997. The new RGAlocus encodes a negative regulator of gibberellin response in Arabidopsis thaliana. Genetics 146: 1087–1099.
- SILVERSTONE, A.L.; CIAMPAGLIO, C.N.; SUN, T. P., 1998. The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. Plant Cell 10:155–170
- SILVERSTONE, A.L.; JUNG, H.S.; DILL, A.; KAWAIDE, H.; KAMIYA, Y. & SUN, T.P. 2001. Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. Plant Cell 13: 1555–1566.
- SINGER, M. A. & LINDQUIST, S., 1998. Trends Biotechnol. 16, 460–468.
- SINGH, A.; KUMAR, J. & KUMAR, P., 2008. Effects of plant growth regulators and sucrose on post harvest physiology, membrane stability and vase life of cut spikes of gladiolus. Plant Growth Regul 55:221–229
- SINGH, P. & MISRA, A., 2001. Influence of gibberellin and ethrel on growth, chlorophyll content, protein, enzyme activities and essential monoterpene oil in a efficient genotype of Mentha spicata var. MSS5. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences, 22-23(4A-1A):283-286.
- SINGH, P. ; SRIVASTAVA, N. K.; MISHRA, A. & SHARMA, S., 1999. Influence of etherel and gibberellic acido n carbon metabolism, growth, and essencial oil accumullation in spearmint (Mentha spicata). Photosynthetica 36(4): 509-517.
- SINHA, N. R.; WILLIAMS, R. E. & HAKE, S., 1993. Overexpression of the maize homeobox gene, Knotted-1, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. Genes Dev. 7, 787–795.
- SLABAS, A. R.; FORDHAM-SKELTON, A. P.; FLETCHER, D.; MARTINEZ-RIVAS, J. M.; SWINHOE, R.; CROY, R. R.; EVANS, I. M., 1994. Characterization of cDNA and genomic clones encoding homologues of the 65 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A in Arabidopsis thaliana. Plant Mol Biol 26: 1125–1138.
- SMEEKENS, S. & ROOK, F., 1997. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. Plant Physiol. 115, 7–13.

- SMEEKENS, S., 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51, 49–81.
- SMITH, D. L.; ABBOTT, J. A. & GROSS, K. C., 2002. Down-regulation of tomato β-galactosidase 4 results in decrease fruit softening. Plant Physiol. 129: 1755-1762.
- SMITH, R. C.; MATTHEWS, P. R.;, SCHÜNMANN, P. H. D.; CHANDLER, P. M., 1996. The regulation of leaf elongation and xyloglucan endotransglycosylase by gibberellin in 'Himalaya' barley (Hordeum vulgare L.). Journal of Experimental Botany 47, 1395–1404
- SMITH, R. D.; WALKER, J. C., 1993. Expression of multiple type 1 phosphoprotein phosphatases in Arabidopsis thaliana. Plant Mol Biol 21: 307–316.
- SMYCZYNSKI,C,; ROUDIER, F.; GISSOT, L.; VAILLANT, E.; GRANDJEAN, O.; MORIN, H.; MASSON, T.; BELLEC, Y.; GEELEN, D. & FAURE, J.D., 2006. The C terminus of the immunophilin PASTICCINO1 is required for plant development and for interaction with a NAC-like transcription factor, J. Biol. Chem. 281, pp. 25475–25484. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (12)
- SOKOLOV, L. N.; DE'JARDIN, A.; KLECZKOWSKI, L. A., 1998. Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in Arabidopsis thaliana, Biochem. J. 336, 681–687.
- SONNEWALD, U. J.; LERCHL, R.; ZRENNER FROMMER, W. B., 1994. Manipulation of source-sink relations in transgenic plants. Plant Cell Environ 17:649–658
- SOUZA-MACHADO, V.; PITBLADO, R.; ALI, A.; MAY, P., 1999.. Paclobutrazol in tomato (Lycopersicon esculentum) for improved tolerance to early transplanting and earlier harvest maturity. Acta Horticulturae. Hague, v. 487, n.2, p.139 -144.
- SPOLLEN, W. G.; LENOBLE, M. E.; SAMUELS, T. D.; BERNSTEIN, N.; SHARP, R. E., 2000. Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. Plant Physiol 122:967–976
- SPONSEL, V. M., 1985. Gibberellins in Pisum sativum their nature, distribution and involvement in growth and development of the plant. Physiologia Plantarum, 65:533-538.
- SRIRAM, G.; MARTINEZ, J. A.; MCCABE, E. R.; LIAO, J. C.; DIPPLE, K. M., 2005. Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play? Am. J. Hum. Genet. 76 911-24
- STEELE, N. M.; SULUVÁ, Z.; CAMPBELL, P.; BRAAM, J.; FARKAS, V. & FRY, S. C., 2001. Ten isoenzymes of xyloglucan endotransglycosylase from plant cell walls select and cleave the donor substrate stochastically. Biochem. J. 355: 671-679.
- STEFFENS, G. L.; BYUN J K.; WANG, S.Y., 1985 Controlling plant growth via the gibberellin biosynthesis system. I. Growth parameter alterations in apple seedlings. Physiol Plant 63: 163-168
- STEYAERT, J., 1997. A decade of protein engineering on ribonuclease T1: atomic dissection of the enzymesubstrate interactions. Eur. J. Biochem, 247, 1-11
- STINCHCOMBE, G. R; COPAS E.; WILLIAMS, R.R.; ARNOLD, G., 1984. The effect of paclobutrazol and daminozide on the growth and yield of cider apple trees. J Hortic Sci 59: 323-327
- STOCKINGER, E. J., GILMOUR, S. J., & THOMASHOW, M. F. 1997. Proc. Natl.Acad. Sci. U. S. A. 94, 1035–1040
- STONE, S. L.; HAUKSDOTTIR, H.; TROY, A.; HERSCHLEB, J.; KRAFT, E. & CALLIS, J., 2005. Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis. Plant Physiol. 137: 13–30.
- STOWE, B. B.& YAMAKI, T., 1975. Ann. Rev. Plant Physiol: 8. 181.
- STRACK, S.; ZAUCHA, J. A.; EBNER, F. F.; COLBRAN, R. J.; WADZINSKI, B. E., 1998. Brain protein phosphatase 2A: developmental regulation and distinct cellular and subcellular localization by B subunits. J Comp Neurol 392: 515–527.

- STRICKLAND, J. A.; MARZILLI, L. G.; PUCKETT, J. M. J.; DOETSCH, P. W., 1991. Purification and properties of nuclease SP. Biochemistry 30: 9749–9756
- STURM, A., 1999. Invertases: Primary structures, functions and roles in plant development and sucrose partitioning. Plant Physiol. 121: 1-8.
- STURM, A.; CHRISPEELS, M., 1990. cDNA cloning of carrot extracellular P-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. Plant Cell 2: 1107-1119
- SUBBAIAH, C. C. & SACHS, M. M., 2001. Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedling. Plant Physiol. 125: 585-594.
- SUE, M.; ISHIHARA, A.; IWAMURA, H., 2000a. Purification and characterization of a b-glucosidase from rye (Secale cereale L.) seedlings. Plant Sci 155: 67–74
- SUE, M.; ISHIHARA, A.; IWAMURA, H., 2000b. Purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside b-glucosidase from wheat (Triticum aestivum L.) seedlings. Planta 210: 432–438
- SUN, J.; LOBODA, T.; SUNG, S. J. S. & BLACK, JR. C. C., 1992. Sucrose synthase in wild tomato, Lycopersicon chmielewskii, and tomato fruit sink strenght. Plant Physiol. 96: 1163-1169.
- SUN, S.; YU, J. P.; CHEN, F.; ZHAO, T. J.; FANG, X. H.; LI, Y. Q.; SUI, S. F., 2008. TINY, a dehydrationresponsive element (DRE)-binding protein-like transcription factor connecting the DRE- and ethyleneresponsive element-mediated signaling pathways in Arabidopsis. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Volume: 283 Issue: 10 Pages: 6261-6271
- SUN, T. P., 2000. Gibberellin signal transduction. Curr. Opinion Plant Biol. 3:374–380.
- SUNG, S. S.; SHEIH, W. J.; GEIGER, D. R. & BLACK, C. C., 1994. Growth, sucrose synthase, and invertase activities of developing Phaseolus vulgaris L. fruits. Plant Cell Environ. 17: 419-426.
- SWAIN, S. M.; TSENG, T.-S., THORNTON, T. M.; GOPALRAJ, M. & OLSZEWSKI, N. E., 2002. SPINDLY is a nuclear-localized repressor of gibberellin signal transduction expressed throughout the plant. Plant Physiol. 129: 605–615.
- SWANSON, M. S.; NAKAGAWA, T. Y.; LEVAN, K. & DREYFUSS, G., 1987. Primary structure of human nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: conservation of sequence and domain structures in heterogeneous nuclear RNA, mRNA, and pre-rRNA-binding proteins. Mol Cell Biol 7, 1731–1739.
- SYMONS, P. R. R., 1989. Paclobutrazol: its application and effect on aspects of plant morphology, anatomy, biochemistry and physiology. Pietermaritzburg: Department of Horticultural Science- University of Natal, 82p.
- TAKAHASHI, N.; KITAMURA, H.; KAWARDA, A.; SETA, T.; TAKAI, M.; TAMURA, S. & SUMIKI, Y., 1955. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan: 19. 267
- TAKAHASHI, N.; YAMAGUCHI, I. & YAMANE, H. Gibberellins. In: TAKAHASHI, N., 1986. ed. Chemistry of plant hormones. Florida, CRC Press, p.57-151.
- TALON, M.; KOORNNEEF, M. & ZEEVAART, J.A.D., 1990B. Accumulation of C19-gibberellins in the gibberellin-insensitive dwarf mutant gai of Arabidopsis thaliana (L.) Hehyn. Planta182: 501–505.
- TALON, M.; KOORNNEEF, M. & ZEEVAART. J. A. D., 1990a. Endogenous gibberellins in Arabidopsis thaliana and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf ga4 and ga5 mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 7983–7987.
- TAN, X.; CALDERON-VILLALOBOS, L. I.; SHARON, M.; ZHENG, C.; ROBINSON, C. V.; ESTELLE, M.; ZHENG, N., 2007. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. Nature. 446:640-5.
- TANIMOTO, E., 1987. Gibberellin-dependent root elongation in Lactuca sativa: Recovery from growth retardant-suppressed elongation with thickening by low concentration of GA3. Plant Cell Physiol. 28: 963–973.

- TANIMOTO, E., 1988. Gibberellin regulation of root growth with change in galactose content of cell walls in Pisum sativum. Plant Cell Physiol. 29: 269–280.
- TANIMOTO, E., 1994a. Interaction of gibberellin A3 and ancymidol in the growth and cell-wall extensibility of dwarf pea roots. Plant Cell Physiol. 35: 1019–1028.
- TANIMOTO, E.,. 2002. Gibberellins. In: PLANT ROOTS The Hidden Half (3rd.Edition). pp. 405–416. Waisel, Y., Eshel, A., and Kafkafi, U., Eds., Marcel Dekker Inc., New York.
- TATYANA, Y. S.; JUN SHI, DURACHKO, D. M.; GUILTINAN, M. J.; MCQUEEN-MASON, S. J. SHIEH, M., & COSGROVE, D. J., 2005. Molecular cloning and sequence analysis of expansins-a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 92, pp. 9245-9249, September 1995 Plant Biology
- TAYBI, T.; PATIL, S.; CHOLLET, R.; CUSHMAN, J.C., 2000. Plant Physiol. 123 1471-1482.
- TAYLOR, N. G.; SCHEIBLE, W. R.; CUTLER, S.; SOMERVILLE, C. R.; TURNER, S. R., 1999. The irregular xylem3 locus of Arabidopsis encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. Plant Cell, 11:769-780.
- TEROL, J.; BARGUES, M.; CARRASCO, P.; PE'REZ-ALONSO, M. & PARICIO, N., 2002. Molecular Characterization and Evolution of the Protein Phosphatase 2A B_ Regulatory Subunit Family in Plants. Plant Physiology, June 2002, Vol. 129, pp. 808–822.
- THE AMBION, 2007. The RNA company. Technotes (8):1 Real-time PCR goes prime time. Disponível em: http://www.ambion.com/techlib/tn/81/813.html
- THEVELEIN, J. M., 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. Microbiol Rev 48: 42–59
- Thomas SG, Phillips AL, Hedden P. 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4698–703
- TIMPA, J. D.; BURKE, J. J.; QUISENBERRY, J. E. & WENDT, C. W., 1986. Effects of water stress on the organic acid and carbohydrate composition of cotton plants. Plant Physiol 82: 724–728
- TODD, C.D.; ZENG, P.; HUETE, A.M.; HOYOS, M.E.; POLACCO, J.C., 2004. Transcripts of MYB-like genes respond to phosphorous and nitrogen deprivation in Arabidopsis. Planta. 219:1003-1009.
- TOWERS, G. H. N.; SINGH, S.; VA HEERDEN, P. S.; ZUICHES, J.; LEWIS, N. G., 1998. Integrating nitrogen and phenylpropanoid metabolic pathways in plants and fungi. In: Lewis N.G., Sarkanen S. (Eds.). Lignin and Lignan Biosynthesis. ACS Symposium Series. 697:42- van Heerden P.S., Towers G.H., Lewis N.G. 1996. Nitrogen metabolism in Lignifying Pinus taeda cell cultures. J Biol Chem. 24:12350-5.
- TRAN, L. S. P. et al 2004. Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. Plant Cell 16, 2481-2498.
- TSUCHIDA, Y.; FURUMOTO, T.; IZUMIDA, A.; HATA, S.; IZUI, K., 2001.FEBS Lett. 507 318-322.
- TURNER, S. R.; SOMERVILLE, C. R., 1997. Collapsed xylem phenotype of Arabidopsis identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. Plant Cell, 9:689-701. Demonstration that mutants with decreased cellulose content can be isolated on the basis of a morphological phenotype.
- TOLEDO-ORTIZ, G.; HUQ, E. & QUAIL, P. H. 2003. The Arabidopsis basic/ helix-loop-helix transcription factor family. Plant Cell 15: 1749–1770.
- TYLER, L.; THOMAS, S. G.; HU, J.; DILL, A.; ALONSO, J. M.; ECKER, J. R. & SUN, T. P. 2004. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. Plant Physiol. 135: 1008–1019.
- TYMOWSKA-LALANNE, Z. & KREIS, M., 1998. Expression of the Arabidopsis thaliana invertase gene family. Planta 207: 259-265.

- UCHIDA, H.; W. U. Y-D.; TAKADERA, M.; MIYASHITA, S.; NOMURA, A., 1993. Purification and some properties of plant endonucleases from scallion bulbs. Biosci Biotechnol Biochem 57: 2139–2143
- UEGUCHI-TANAKA, M.; ASHIKARI, M.; NAKAJIMA, M.; ITOH, H.; KATOH, E.; KOBAYASHI, M.; CHOW, T.Y.; HSING, Y. I.; KITANO, H., YAMAGUCHI, I., & MATSUOKA, M., 2005. Gibberellin insensitive dwarf1 encodes a soluble receptor for gibberellin. Nature 437: 693–698.
- UNGER, C.; HARDEGGER, M.; LIENHARD, S.; STURM, A., 1994. cDNA cloning of carrot soluble acid P-fructofuranosidases and comparison with the cell wall isoenzyme. Plant Physiol 104: 1351-1357.
- UOZU, S,; TANAKA-UEGUCHI, M.; KITANO, H.; HATTORI, K.; MATSUOKA, M., 2000. Characterization of XET-related genes of rice. Plant Physiology 122, 853–859
- UTTER, M. F.; KOLENBRANDER, H. M., 1972. P.D. Boyer (Ed.), The Enzymes, vol. 6, Academic Press, New York and London, , pp. 117–136.
- VAIDYANATHAN, R.; KURUVILLA, S. & THOMAS, G., 1999. Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. Plant Sci. 140, 25–36.
- VAN DEN HEUVEL, K. J. P. T.; HEIJNEN, P. H. F.; BARENDSE, G. W. M, WULLEMS, G. J., 2000. Expression of two gibberellin-regulated cDNAs during early flower development in tomato (Solanum lycopersicon). Effect of grafting and paclobutrazol. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 108, n. 1, p. 95-100.
- VANDENBUSSCHE, F.; HABRICOT, Y.; CONDIFF, A. S.; MANDINEY, R.; STRAETEN, D. V. & AHMAD, M., 2007. HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal, Oxford, v. 49, n. 3, p. 428-41.
- VANDENBUSSCHE, F.; PIERIK, R.; MILLENAAR, F. F.; VOESENEK, L. A.& VAN DER STRAETEN, D., 2005. Reaching out of the shade. Current Opinion in Plant Biology, London, v. 8, p. 462-468.
- VARGAS, W.; CUMINO, A.; SALERNO, G.L., 2003. Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol? Planta 216: 951-960.
- VERMEL, M.; GUERMANN, B.; DELAGE, L.; GRIENENBERGER, J. M.; MARECHAL-DROUARD, L. & GUALBERTO, J. M., 2002. A family of RRM-type RNA-binding proteins specific to plant mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA 99, 5866–5871.
- VIDAL, J.; CHOLLET, R., 1997. Trends Plant Sci. 2, 230-237.
- VISSENBERG, K.; FRY, S. C. & VERBELEN, J. P., 2001. Root hair initiation is coupled to a highly localized increase of xyloglucan endotransglycosylase action in Arabidopsis roots. Plant Physiol. 127: 1125-1135.
- VON CAEMMERER, S.; QUINN, V.; HANCOCK, N. C.; PRICE, G. D.; FURBANK, R. T.; LUDWIG, M., 2004. Carbonic anhydrase and C4 photosynthesis: a transgenic analysis. Plant Cell Environ 27: 697–703
- VON SCHAEWEN, A.; STITT, M.; SCHMIDT, R.; SONNEWALD, U.; WILLMITZER, L., 1990. Expression of yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and Arabidopsis plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influents growth and phenotype of transgenic tobacco plants. EMBO J 9: 3033-3044
- VOLLBRECHT, E. et al, 1991. Nature 350 (6315) 241-243
- VU, J.C. & YELENOSKI, G. 1992. Growth and photosyntesis of sweet orange plants treated with paclobutrazol. Journal of Plant Growth Regulation, v.11, p.85-89.
- WALKER, L.; ESTELLE, M., 1998. Molecular mechanisms of auxin action. Curr Opin Plant Biol. 1:434-9.
- WANG, A. Y., KAO, M. H., YANG, W. H.; SAYION, Y.; LIU, L. F.; LEE, P. D. & SU, J. C., 1999. Differentially and developmentally regulated expression of three rice sucrose synthase genes. Plant Cell Physiol. 40: 800-807.
- WANG, C. S.; LIAU, Y. E.; HUANG, J.C.; WU, T. D.; SU, C. C. & LIN, C. H., 1998. Characterization of a desiccation-related protein in lily pollen during development and stress. Plant Cell Physiol. 39, 1307–1314.

- WANG, F.; SANZ, A.; BRENNER, M. L. & SMITH, A., 1993. Sucros e synthase, starch accumulation and tomato fruit sink strengh. Plant Physiol. 101: 321-327.
- WANG, S. Y.; BYUN, J. K.; STEFFENS, G. L., 1985 Controlling plant growth via the gibberellin biosynthesis system. II. Biochemical and physiological alterations in apple seedlings. Physiol Plant 63: 169-175
- WANG, S.Y. & STEFFENS G. L., 1985 Effect of paclobutrazol on water stress-induced ethylene biosynthesis and polyamine accumulation in apple seedling leaves. Phytochemistry 24: 2185-2190
- WEAVER, L. M.; GAN, S.; QUIRINO, B.; AMASINO, R. M., 1998. A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. Plant Mol Biol 37: 455–469
- WEIL, M.; RAUSCH, T., 1990. Cell wall invertase in tobacco. Plant Physiol94 1575-1581
- WEIR, I.; LU, J.; COOK, H.; CAUSIER, B.; SCHWARZ-SOMMER, Z. & DAVIES, B., 2004. CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in Antirrhinum, Development 131, pp. 915–922. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (48)
- WEN, C.K. & CHANG, C., 2002. Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. Plant Cell 14: 87–100.
- WENDEHENNE, D.; PUGIN, A.; KLESSIG, D. F. & DURNER, J., 2001. Trends Plant Sci. 6, 177-183.
- WESCHKE, W.; PANITZ, R.; GUBATZ, S.; WANG, Q.; RADCHUK, R.; WEBER, H. & WOBUS, U., 2003. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar rations in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. Plant J. 33: 395-411.
- WIDMANN, J. W.; GIBSON, S.; JARPE, M. B. & JOHNSON, G. L., 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol. Rev. 79, pp. 143–180.
- WIGGE, P. A.; KIM, M. C.; JAEGER, K. E., et al, 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in arabidopsis. Science 309: 1056–1059.
- WILSON, R. N. & SOMERVILLE, C., 1995. Phenotypic suppression of the gibberellin-insensitive mutant (gai) of Arabidopsis. Plant Physiol. 108: 495–502.
- WILSON, R. N.; HECKMAN, J. W. & SOMERVILLE, C., 1992. Gibberellin is required for flowering in Arabidopsis thaliana under short days. Plant Physiol. 100: 403–408
- WOBUS, U. & WEBER, H., 1999. Sugars as signal molecules in plant seed development. Biol. Chem. 4: 401-407.
- WU, L.; MITCHELL, J. P., COHN, N. S.; KAUFMAN, P. B., 1993. Gibberellin (GA3) enhances cell wall invertase activity and mRNA levels in elongating dwarf pea (Pisum sativum) shoots. Int J Plant Sci 154:280–289
- XIE, Q.; GUO, H.S.; DALLMAN, G.; FANG, S.; WEISSMAN, A.M. & CHUA, N.H., 2002. Sinalization. promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals, Nature 419, pp. 167–170. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (119)
- XIE, Q.; SANZ-BURGOS, A. P.; GUO, H.; GARCIA, J.A. & GUTIERREZ, C., 1999. GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein, Plant Mol. Biol. 39, pp. 647–656. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (78)
- XIONG, L & ZHU, J. K., 2001. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. Physiol. Plantarum. 112, 152-166
- YAJUN, W.; MEELEY, R. B. & COSGROVE, D. J., 2001. Analysis and Expression of the a-Expansin and b-Expansin Gene Families in Maize. Plant Physiology, Vol. 126, pp. 222–232
- YAMASHITA, K.; KITAZONO, K. & IWASAKI, S., 1997. Flower bud differentiation of Satsuma mandarin as promoted by soil drenching treatment with IAA, BA or paclobutrazol solution. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, v.66, p.67-76.

- YAN, L., FU, D., LI, C., et al 2006. The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 103: 19581–19586.
- YANG, B.; VERKMAN, A. S.; 1997. Water and glycerol petmeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in Xenopus oocytes. J Biol Chem 272:16140-16146.
- YANO, M.; KATAYOSE, Y., ASHIKARI, M., et al, 2000. Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene CONSTANS. The Plant Cell 12: 2473–2484.
- YAXLEY, J. R.; ROSS, J. J.; SHERRIFF, L. J. & REID, J. B., 2001. Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. Plant Physiol. 125: 627–633.
- YU, S. M., 1999. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. Plant Physiol 121:687-693
- YU, S. M., 1999. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. Plant Physiol. 121, 687-693.
- YUPSANIS, T.; ELEFTHERIOU, P.; KELEPIRI, Z., 1996. Separation and purification of both acid and neutral nucleases from germinated alfalfa seeds. J Plant Physiol 149: 641–649
- ZEEVAART, JAD., 1983. Gibberellins and flowering. In A Crozier, ed, The Biochemistry and Physiology of Gibberellins, Vol 2. Praeger Publishers, East Sussex, pp 333-374
- ZHOU, L.; JAN, J.-C.; JONES, T. L. & SHEEN, J., 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 10294–10299.
- ZRENNER, R.; SALANOUBAT, M.; WILLMITZER, L. & SONNEWALD, U., 1995. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (Solanum tuberosum L.). Plant J. 7: 97-107.
- ZUREK, D. M. & CLOUSE, S. D., 1994. Molecular cloning and characterization of a brassinsteroid-regulated gene from elongation soybean epicotyls. Plant Physiol. 104: 161-170.