UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



i

Diana Santos Branco

"Sinalização por carboidratos em cana-de-açúcar e divergência evolutiva"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) 1 Branco Diliha e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética vegetal e melhoramento

Orientador: Prof. Dr.Michel G. A. Vincentz Co-Orientadora: Profa. Dra. Juliana de Maria Félix

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP



Título em inglês: Sugar signaling in sugarcane and evolution diversification.

Palavras-chave em inglês: Sugarcane; Angiosperms; Phylogeny; Sugar signalling.

Área de concentração: Genética vegetal e melhoramento.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Michel Georges Albert Vincentz, Sabrina Moutinho Chabregas, Marcelo Menossi Teixeira.

Data da defesa: 29/07/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 29 de jul ho de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Michel G. A. Vincentz

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Dra. Sabrina Coutinho Chabregas

Prof. Dr. José Andrés Yunes

Prof. Dr. Gláucia Mendes de Souza

Assinatura

Assinatura

Assinatura Assinatura 0 alligan Assinatura

"Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution"

Theodosius Dobzhansky (1900-1975)

"Aos meus queridos pais, meus pilares de sustentação, pelo amor, apoio e paciência."

Agradecimentos

Ao Michel, umas das pessoas mais íntegras e inteligentes que já conheci. Obrigada pela paciência, horas de dedicação e excelente orientação.

À Dra. Juliana Félix, minha co-orientadora, uma das grandes responsáveis pelo início deste trabalho. Obrigada pelas idéias, discussões e correções da tese.

Aos membros da banca, Dr. Marcelo Menossi e Dra. Sabrina Chabregas.

Aos membros da pré-banca, Ricardo Dante e Celso Benedetti, pelas críticas e sugestões a este trabalho.

Ao Dudu, um grande amigo e colaborador de todas as análises filogenéticas apresentadas neste trabalho.

À Dra. Gláucia Mendes Souza, pela colaboração no projeto e por gentilmente ceder seu laboratório para realização dos experimentos de microarranjos e qRT-PCR.

Aos membros do laboratório de Genética Molecular de Plantas/Arabidopsis, Amanda, Dudu, Cleverson, Gustavo, Daniela, Mariane, Tamie e Sandra, pelo apoio, críticas, pelas discussões tão produtivas, pelas "pérolas" e por me ajudarem a crescer como pessoa e pesquisadora. Em especial, um agradecimento ao ex membro Juarez, um grande amigo que muito colaborou nesta etapa final.

Ao pessoal do laboratório de Transdução de sinais do IQ-USP, que me recebeu com tanta cordialidade e paciência por 5 meses, em especial ao Alessandro, Carlos e Milton, que muito me ajudaram nos experimentos e nas análises estatísticas.

Às minhas amigas e companheiras de república, Lígia, Ana Laura, Daniela, Juliana, Talita, Marília e Maíra, pela paciência nesses últimos meses e por tornarem minhas noites e finais de semanas muito mais divertidos.

Aos meus grandes amigos Hugo, companheiro fiel de Morumbi e cinema, e Daniel por sempre estar ao meu lado, mesmo que tão distante.

À minha amiga Marília, pelos conselhos, conversas, risos e choros de 10 anos de amizade e principalmente por me hospedar durante 5 meses em sua casa!

Ao Fer, que mesmo do outro lado do Atlântico, me ajudou com minhas incertezas e agüentou minhas reclamações. Ainda bem que você já voltou!

Ao pessoal do CBMEG, por anos de convívio, colaboração e amizade.

Aos meus pais e ao meu irmãozinho, pelo incentivo, paciência em tantos momentos difíceis e por sempre acreditarem em meu potencial.

Muito Obrigada!!!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTADE TABELAS	XV
ABREVIAÇÕES	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix

1. Introdução

<u>1.1. Carboidratos: substratos e sinalizadores</u>	21
1.2. A levedura como modelo em vias de sinalização por açúcares	22
1.3. Vias de sinalização por açúcares em plantas	25
1.3.1. Sinalização por glicose em plantas	26
1.3.2. Sinalização por sacarose em plantas	29
1.4. Histórico e importância econômica da cana-de-açúcar	30
<u>1.5. Os projetos SUCEST e SUCAST</u>	32
1.6. Acúmulo de sacarose e sinalização por açúcares	34
<u>1.7. Evolução das Angiospermas</u>	35
1.8. Grupos de ortólogos	37
<u>1.9. A tecnologia dos microarranjos</u>	41

2. Objetivos

<u>2.1. Gerais</u>	43
2.2. Específicos	43

3. Material e Métodos

3.1. Catálogo SUCAST	44
3.2. Material biológico e condições de cultivo	46
3.3. Tratamentos	48
3.4. Extração e análise do RNA total	48
3.5. Purificação do RNA Total para os ensaios de microrranjos	49
3.6. Síntese e marcação do cDNA	50
3.7. Hibridização manual dos alvos marcados nos microarranjos de cDNA	52
3.8. Extração e análise dos dados	52
3.9. Reações de transcrição reversa para PCR em tempo real	54
3.10. Reações de PCR em tempo real (qRT-PCR)	55
3.11. Análise comparativa entre as seqüências de cana-de-açúcar e Arabidopsis	
thaliana	58

PARTE 1

4. Resultados	
<u>4.1. RNA</u>	60
4.2. Relação entre genes de reposta rápida a açúcar e acúmulo de sacarose em cana-	
<u>de-açúcar</u>	63

<u>4.3. Genes responsivos à sacarose</u>	69
4.3.1. Genes induzidos por sacarose	69
4.3.2. Genes reprimidos por sacarose	69
<u>4.4. Genes responsivos à glicose</u>	71
4.4.1. Genes induzidos por glicose	71
4.4.2. Genes reprimidos por glicose	71
4.5. Genes regulados especificamente por sacarose	73
4.6. Acúmulo de sacarose e resposta a açúcar	76
<u>4.6.1. Mesmo sentido de resposta</u>	78
<u>4.6.2. Sentido oposto de resposta</u>	80
4.7. Avaliação preliminar da conservação evolutiva das redes de sinalização por	
<u>açucares</u>	81
4.7.1. SAS que apresentam genes ortólogos em Arabidopsis	86
4.7.2. SAS monocotiledônea-específicos	88
4.7.3. SAS que apresentam homólogos relacionados	89
5. Discussão	
5.1. Ortólogos com mesmo sentido de resposta	90
5.2. Ortólogos com sentido oposto de resposta	98
5.3. Resposta sacarose-específica	100
PARTE 2	
6. Genes diferencialmente expressos em resposta à sacarose no chip SUCAST	102
6.1. SAS reprimidos por sacarose no chip SUCAST	108
6.2. SAS induzidos por sacarose no chip SUCAST	108
7. Análise comparativa entre a regulação por sacarose e/ou glicose de genes em cana-	
de-acúcar e seus genes ortólogos ou homólogos relacionados em <i>Arabidopsis thaliana</i> .	
	115
7.2. SAS que apresentam genes ortólogos em <i>Arabidopsis thaliana</i> .	116
7.2.1. SAS que apresentam ortólogos em <i>Arabidopsis thaliana</i> que não são regulados	
por acúcar	116
7.2.2. SAS que apresentam ortólogos <i>Arabidopsis thaliana</i> regulados por acúcar	118
7.2.3. SAS monocotiledônea específicos	120
7.2.4. SAS que apresentam genes homólogos relacionados em <i>Arabidopsis thaliana</i> .	
	121
8. Discussão	
8.1. Ortólogos com mesmo sentido de resposta	122
8.2. Ortólogos com sentido oposto de resposta	123
8.3. Ortólogos com mesmo sentido e sentido oposto de resposta	124
set strategos com mesmo sentado e sentado oposto de respustu	147
9 Conclusões e Perspectivas	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
Anevo: árvores filogenéticas	1/10
הווכתט. מו עטובט וווטצרווכווכמי	14ð

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de sinalização por glicose em Saccharomyces cerevisiae.	23
Figura 2. Papel da KIN10/11 como regulador chave em sinais de açúcar, estresse, metabolismo e desenvolvimento.	24
Figura 3. Modelo das interações genéticas entre açúcar e sinalização hormonal.	28
Figura 4. Possíveis destinos de genes duplicados segundo uma trajetória temporal.	38
Figura 5. Representação das relações evolutivas de ortologia e paralogia entre genes.	40
Figura 6. Plântulas de cana-de-açúcar em meio de cultura com idade de 13 dias	47
Figura 7. Análise dos RNAs totais de plântulas de cana-de-açúcar tratadas por diferentes açúcares.	60
Figura 8. Variação de resposta dos genes GAPDH, PUB, TUB, UB e UBE2 a tratamento por carboidratos.	61
Figura 9. Regulação da expressão de genes relacionados a acumulo de sacarose no colmo de cana de açúcar em resposta a manitol	68
Figura 10. Análise quantitativa da expressão de 24 genes candidatos em resposta à glicose e/ou sacarose.	74
Figura 11. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCRFLR2037F09.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	146
Figura 12. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCEQRT1024E12.g NC contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas.	147
Figura 13. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCRZ1001G10.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	148
Figura 14. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx dos SASs SCACLR2007G02.g e SCRFLR1034G06.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas.	148

Figura 15. Relações filogenéticas dos quinze primeiros hits de tblastx do SAS SCQGLR1085F11.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	150
Figura 16. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCBGLR1023D05.g C contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas.	151
Figura 17. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCRT1001E01.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	151
Figura 18. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCJFRZ2032G01.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	153
Figura 19. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCMCRT2103B04.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas.	154
Figura 20. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCAM1001A03.gcontra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	155
Figura 21. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1C05B07.g contra o banco de genoma completo de plantas.	156
Figura 22. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCJFRT1005C11.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	157
Figura 23. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCRZ1001H05.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	158
Figura 24. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCRT2001H11.g NC contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas.	159
Figura 25. Relações filogenéticas dos quarenta e seis primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR2C01F06.g NC contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas.	160
Figura 26. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR2003E10.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	161
Figura 27. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCEZHR1088E02.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	162
Figura 28. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS	

Х

SCEPRZ1009C10.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	163
Figura 29. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCAGLR1021G10.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	164
Figura 30. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCBFSB1046D04.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	165
Figura 31. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1024E11.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas	166
Figura 32. Relações filogenéticas dos trinta e sete primeiros hits de tblastx do SAS SCEPRZ1010E06.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas.	167
Figura 33. Relações filogenéticas dos quarenta e um primeiros hits de tblastx do SAS SCJLHR1028C12.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas.	168
Figura 34. Gráfico M x S, normalização dos dados e intensidade dos fluoróforos para dois experimentos comparando-se a expressão de genes a partir de uma situação controle e um tratamento com sacarose 3%.	105
Figura 35. Dispersão dos pontos no gráfico M x S para os experimentos de microarranjos.	106
Figura 36. Distribuição e número de genes diferencialmente expressos em resposta à sacarose segundo a categoria funcional na qual estão incluídos no CHIP SUCAST.	107
Figura 37. Validação por PCR em tempo real da regulação de quatro genes que se mostraram diferencialmente expressos a partir do CHIP SUCAST.	114
Figura 38. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCACLR2029F03.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.	169
Figura 39. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCMCCL6052C09.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.	170
Figura 40. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS	

xi

SCCCCL1002D10.b contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.

Figura 41. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCJFRT1059D05.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 42. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCRFLB1056F07.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 43. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCRZ3002D03.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 44. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCSBST3101E05.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 45. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1077F09.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 46. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCEQRT1027E02.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 47. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCAGLB2046F06.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 48. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCBGLR1002A09.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 49. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCQGLR2017B03.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 50. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1066D10.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 51. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de thlastx do SAS

Figura 51. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCUTST3084F06.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.

	182
Figura 52. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCSGLR1025H02.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.	183
Figura 53. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCACCL6009G07.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.	184
Figura 54. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCQSLR1061E06.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.	185
Figura 55. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCACHR1040D12.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.	186
Figura 56. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCBFSB1046D04.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.	187
Figura 57. Relações filogenéticas dos trinta e nove primeiros hits de tblastx do SAS SCBFFL4114B06.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.	188
Figura 58. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1C01H09.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.	189
Figura 59. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCQSLB1052B11.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.	190
Figura 60. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCRLRZ3041C03.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.	191
Figura 61. Relações filogenéticas dos vinte e nove primeiros hits de tblastx do SAS SCRUSB1062E12.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.	192
Figura 62 Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de thlasty do SAS	

Figura 62. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCEZRZ1015D09.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.

Figura 63. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCBFSB1048C08.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 64. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCEPRZ1008A04.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 65. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1072F12.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 66. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1C07B07.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 67. Relações filogenéticas dos trinta e sete primeiros hits de tblastx do SAS SCCCRZ2001A10.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 68. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCJFSB1010G10.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 69. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCJLLR1054C03.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 70. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCSBST3096H04.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 71. Relações filogenéticas dos trinta e três primeiros hits de tblastx do SAS SCUTLR1058C02.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.
Figura 72. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCVPFL3048G05.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo.

LISTA DE TABELAS

Tabela1. Categorias presentes nos microarranjos SUCAST.	45
Tabela2. Primers utilizados nos experimentos de <u>gRT-PCR</u> .	57
Tabela3. SAS responsivos à sacarose, glicose e manitol em plântulas de cana-de- açúcar	66
Tabela 4. Regulação dos 24 genes em tratamentos de sacarose/glicose e genótipos contrastantes para acúmulo de sacarose em genótipos de cana-de-açúcar com alto Brix e em entrenó maduros.	77
Tabela 5 . Relações de ortologia e regulações pelos açúcares sacarose e glicose entreos 24 SAS de cana-de-açúcar e os genes de Arabidopsis.	84
Tabela 6. Desenho experimental conduzido para a realização das hibridizações das amostras de cDNA de plântulas de cana-de-açúcar utilizando o chip SUCAST.	103
Tabela 7. Lista de SAS, categorias, subcategorias e ratio (valor $up/down$) que semostraram diferencialmente expressos no chip SUCAST em resposta a sacarose 3%.	110
Tabela 8. SAS responsivos ao manitol.	112

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ABA	Ácido Abiscísico
AMPK	AMP-dependent protein kinase
ASN1	Asparagina sintetase 1
ATB2	gene ATB2
bZIPs	basic zipper leucine
CAB2	gene CAB2
CRT	Calreticulina
EIN3	ethylene insensitive3
ESTs	Expressed Sequence Tags
gin2	glucose insensitive 2
HMG-CoAR	3-hidroxi 3-metilglutaril-coenzima A redutase
НХК	Hexoquinase
HXK1	Hexoquinase-1
Hxk2	Hexoquinase-2
NR	nitrato-redutase
PAL	fenilalanina amônia-liase
PKs	proteínas quinases
PPs	fosfatases
ProDH2	prolina desidrogenase
QTL	quantitative trait loci
RNAm	RNA mensageiro
RPT5B	partícula 19S da subunidade proteossômica
SAS	Sugarcane Assembled Sequence
Snfl	Sucrose non-fermenting1
Snf3	Sucrose non-fermenting3
SnRK	Sucrose non-fermenting related kinase
SnRK1	Sucrose non-fermenting related kinase-1
SnRK2	Sucrose non-fermenting related kinase-2
SnRK3	Sucrose non-fermenting related kinase-3
SPS	sacarose fosfato sintase
SUCAST	Sugarcane Signal Transduction
SUCEST	Sugarcane EST
T6P	trealose-6-fosfato
VHA-B1	vacuolar H ⁺ -ATPase B1
VvHT1	gene VvHT1
Yck1	Caseína quinase 1

<u>Resumo</u>

Além de fonte primária de carbono e energia para os principais tipos celulares, os açúcares produzidos pela fotossíntese adquiriram importantes funções ao longo da evolução das plantas, no controle do crescimento e desenvolvimento, do metabolismo e na resistência a estresses abióticos (osmótico, energético) e bióticos (potógenos). Os acúcares atuam como sinalizadores ativando cascatas de transdução e, desta forma, promovendo mudanças na programação da expressão gênica. Com o objetivo de entendermos como a sinalização por açúcares diversificou-se em angiospermas, iniciamos uma análise comparativa dos perfis de expressão gênica em resposta aos açúcares sacarose e glicose em plântulas da monocotiledônea Saccharum spp e da eudicotiledônea Arabidopsis thaliana. Para tanto, duas abordagens foram utilizadas. O primeiro aspecto do trabalho estabeleceu relações entre elementos de resposta rápida (resposta primária) a açúcar e acúmulo de sacarose em genótipos de cana contrastantes para teor de sacarose. Outra abordagem, mais abrangente, procurou identificar genes diferencialmente expressos em resposta à sacarose. Na primeira parte do trabalho, a análises por qRT-PCR revelaram uma clara relação entre genes envolvidos em acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar e sinalização primária por carboidratos. A partir de 34 SAS (Sugarcane Assembled Sequence) testados envolvidos em acúmulo de sacarose em cana, 24 deles também foram responsivos à glicose e/ou sacarose, sendo que 9 deles responderam em um mesmo sentido em genótipos de cana-de-açúcar que acumulam maior quantidade de sacarose (alto Brix). Dos 24 SAS responsivos à sacarose e/ou glicose, apenas 6 deles apresentaram genes ortólogos em Arabidopsis thaliana cuja regulação por estes acúcares ocorreu de maneira similar. Dentre eles, temos o fator de transcrição IAA16, que se mostrou reprimido por sacarose e glicose, constituindo um possível gene de interação entre sinalização por açúcares e auxina. Duas SNFs quinases

parálogas de cana-de-açúcar tem como ortólogo um único gene de Arabidopsis thaliana. Os três genes foram reprimidos por sacarose e glicose, sendo outra parte conservada, na via de sinalização a açúcares entre as duas espécies. Outro gene de particular interesse corresponde a uma deidrina, reprimida por sacarose e glicose em cana, assim como seu ortólogo em Arabidopsis e genótipos alto Brix, sugerindo importante papel deste gene em processos relacionados a sinalização/acúmulo de sacarose. Na segunda parte do trabalho, utilizando-se a técnica de microarranjos de cDNA a partir do chip SUCAST, encontramos 55 genes diferencialmente expressos em resposta à sacarose. Destes, apenas 3 apresentaram genes ortólogos de Arabidopsis regulados por açúcar num mesmo sentido que em cana, correspondentes a duas proteínas quinases e a um gene pseudo-response-regulator. Este estudo preliminar identificou genes conservados da sinalização por acúcares em angiospermas aue representam possíveis nós importantes das redes de controle relacionadas a carboidratos. O estabelecimento de um possível envolvimento de alguns destes genes no controle da capacidade de acumular mais sacarose no colmo da cana, abriu novas perspectivas na análise molecular desta importante característica. Estudos mais abrangentes são necessários para melhorar os conhecimentos sobre o grau de diversificação da sinalização por açúcares em angiospermas e os valores adaptativos associados.

Abstract

Besides act as carbon primary source in the major types of cells, sugars produced by photosynthesis acquired important functions in the course of plant's evolution like controlling growth, development, and metabolism and acting in resistance to abiotic and biotic stresses like osmotic, energetic and response to pathogens. Sugars can be signals that active signal transduction pathways to change genes expression programs. In order to access the diversification of sugar pathway signaling in angiosperms we conduct comparative analysis of the gene expression in response to sucrose and glucose in seedlings of the monocot *Saccharum sp.* and the eudicot *Arabidopsis thaliana*. We also aimed to access the possible correlation between genes related to sucrose storage in sugar-cane and genes related to primary sugar responses. Another aim was to identify deferentially expressed genes in sucrose response.

A clearly relation between genes related to sucrose storage in sugar-cane and quickly primary response to sugars was obtained by qRT-PCR analysis. We tested 34 SAS (Sugar Assembled Sequence) related to sucrose storage in sugar-cane and we found that 24 of them were responsive to glucose and/or sucrose. Nine genes showed the same expression pattern (induction or repression) in response to sugar as seen in high Brix genotypes. Six, of this 24 genes, have *Arabidopsis* orthologues regulated in the same direction (induced or repressed). One is an IAA16 transcription factor that is repressed by both, glucose and sucrose, and may play a role in an integrative pathway of sugar and auxin responses. We also find two SNFs kinases (paralogues) related to a single *Arabidopsis* ortholog showing the repression response. Another interesting gene is a dehydrin that was repressed in response to sucrose and glucose in sugar-cane and *Arabidopsis* (its ortholog) and in the high Brix sugar-cane genotypes. It suggests an important role for this dehydrin in processes related to sucrose signaling and storage.

In the second part of this work, the sugar-cane cDNA microarray chip, called SUCAST, allow us to identify 55 deferentially expressed in response to sucrose. Only three of these genes have orthologues regulated in same way in sugar-cane and *Arabidopsis*. These genes correspond to two protein-kinase and a pseudo-response regulator. This preliminary approach leads us to identify conserved genes in sugar signaling among angiosperms that possibly represents important nodes in the regulatory networks in response to sugars.

Establishing the involvement of some of these genes in the ability of sucrose storage in sugar-cane's culm will lead us to new perspectives in the molecular basis of this characteristic. More specific works are also needed to improve the knowledge about the real degree of evolutive diversification in sugar signaling among angiosperms and associated genetic fitness.

1. Introdução

1.1. Carboidratos: substratos e sinalizadores

A vida na Terra depende, basicamente, da fixação do carbono através da fotossíntese, da energia da luz, das moléculas de açúcar ricas em energia e da concomitante produção de oxigênio. Consistente com sua importância como a fonte primária de carbono e de energia para os principais tipos celulares, os açúcares adquiriram importantes funções ao longo da evolução, dentre eles o controle do metabolismo, resistência ao estresse, crescimento e desenvolvimento em bactérias, fungos, plantas e animais.

O papel regulatório dos açúcares e dos nutrientes em geral é melhor elucidado em microrganismos de vida livre, que apresentam grande plasticidade bioquímica, em virtude de freqüentes variações do ambiente pelas quais estão sujeitos. Em organismos multicelulares, a manutenção da homeostase energética e nutricional de células e tecidos é de importância vital ao crescimento e desenvolvimento e requer constante monitoramento da disponibilidade de nutrientes e ajustes do uso ou estocagem.

Deficiências nessa homeostasia podem causar dramáticas conseqüências como, por exemplo, a diabete nos mamíferos. Em organismos fotossintéticos e sésseis como as plantas, a manutenção da homeostase energética requer mecanismos regulatórios ainda mais sofisticados para responder a plasticidade fisiológica e de desenvolvimento encontrada nesses organismos.

Nos últimos anos, tornou-se evidente o papel central desempenhado pelos açúcares como sinalizadores e seus efeitos no crescimento e desenvolvimento das plantas. As leveduras têm sido de fundamental importância e funcionam como organismo modelo experimental no estudo das vias de sinalização por açúcar em eucariotos.

1.2. A levedura como modelo em vias de sinalização por açúcares

Estudos em Saccharomyces, um modelo eucariótico essencial nos estudos de regulação por carboidratos, demonstraram que o gene Hxk2 (hexoquinase-2) exerce papel fundamental na repressão de genes relacionados ao catabolismo de fontes de carbono nãofermentáveis em resposta a alta concentração de glicose no meio (Alms, 1999; Moreno et al, 2005). Esta repressão ocorre pela interação de Hxk2 com a proteína repressora Mig1 no núcleo (Ahuatzi et al, 2004), impedindo a fosforilação desta última pela proteína quinase Snf1 (Sucrose non-fermenting1). A fosforilação de Mig1 é promovida por Snf1 em baixas concentrações de glicose e determina sua exportação do núcleo e a desrepressão de genes relacionados ao catabolismo de fontes alternativas de carbono como a sacarose (Sarma, 2007) e ao metabolismo aeróbico (Polge & Thomas, 2006) (Figura 1). A proteína Snf1 possui grande similaridade com a família das quinases AMPk (AMP-dependent protein kinase) de mamíferos (Hong et al, 2003) e SnRKs (Sucrose non-fermenting related kinases) de plantas (Halford & Hardie, 1998). Estas proteínas quinases desempenham papéis fundamentais na manutenção da homeostasia energética e as similaridades observadas entre estas proteínas sugerem mecanismos de monitoramento energético conservados em todos os eucariotos (Polge & Thomas, 2006). As proteínas quinases são importantes elementos em vias de sinalização em virtude de seu papel na fosforilação de proteínas, participando em vias de crescimento e desenvolvimento, bem como em resposta a mudanças ambientais. A família SnRK de plantas apresenta três subgrupos, formados de acordo com a similaridade da següência e estrutura do domínio conservado. As proteínas SnRK1 estão mais relacionadas a Snf1 de fungos e AMPK de mamíferos (Halford et al., 2003). As proteínas SnRK2 e SnRK3 (também conhecidas por CIPK) são provavelmente específicas de plantas (Halford et al., 2003). Recentemente, foram caracterizadas em Arabidopsis thaliana duas SnRK1s ativadas em condições de privação energética e

reprimidas por glicose, kin10 e kin11. Estas duas quinases têm papel central na mudança do perfil de transcrição em respostas a escuro, açúcar e condições de estresse nutricional. Elas atuam ativando a expressão de genes relacionados a vias catabólicas, sendo capazes de providenciar novas fontes de carbono a partir da degradação de parede celular, mobilização de amido, degradação de lipídios, proteínas e aminoácidos e reprimindo genes relacionados ao anabolismo (síntese de parede celular, proteínas, aminoácidos) através de uma rede de sinalização que inclui fatores de transcrição tipo bZIP (Baena-González et al, 2007) (Figura 2).







desenvolvimento, reprodução, senescência

Figura 2. Papel da KIN10/11 como regulador chave em sinais de açúcar, estresse, metabolismo e desenvolvimento. As plantas são constantemente alvos de mudanças bioquímicas e fisiológicas decorrente de estresses. O sinal de estresse é convergido como um sinal de deficiência de energia, levando à ativação da KIN10/11. Em tecidos autotróficos, glicose e sacarose inibem a ação da KIN10/11, mesmo sob ação de efeitos de estresse. As proteínas quinases (PKs) e fosfatases (PPs) upstream participam deste sistema de sinalização e pode contribuir com a especificidade celular e tecidual do sinal. A ativação da KIN10/11 inicia um processo de economia de energia levando à repressão de vias biossintéticas, estimulando processos catabólicos e a fotossíntese como forma de se economizar ou obter/produzir ATP. Como podemos ver, a regulação da KIN10/11 envolve uma reprogramação transcricional que afeta tanto vias de sinalização conservadas quanto vias de sinalização específicas de plantas. Esta rede de sinalização inclui fatores de transcrição da família dos bZIPs. Além de seu papel na manutenção da homeostase energética da célula e na tolerância a estresse, a KIN10/11 também influencia o crescimento, desenvolvimento, reprodução e senescência nas plantas. (NR-nitrato-redutase; SPS-sacarose fosfato sintase; HMG-CoAR-3-hidroxi 3-metilglutaril-coenzima A redutase. Figura adaptada de (Baena-González et al, 2007).

1.3. Vias de sinalização por açúcares em plantas

Os açúcares desempenham um papel fundamental na vida das plantas: são produzidos através da fotossíntese, transportados aos tecidos drenos para carbono, utilizados na respiração para fornecimento de energia no escuro, estocados na forma de amido ou utilizados na formação de carboidratos mais complexos como a celulose e hemicelulose. Mais do que isso, os acúcares ainda representam uma fonte de esqueleto para síntese de compostos como aminoácidos e ácidos graxos. Tais processos metabólicos foram amplamente estudados. Contudo, outro aspecto relacionado aos processos biológicos dos açúcares nas plantas tornou-se o foco mais recente: seu papel na sinalização. Eles podem atuar como sinalizadores, alterando a expressão gênica de forma semelhante ao que foi descrito no caso dos hormônios. A sinalização por açúcar pode ser definida como o reconhecimento da molécula de acúcar por uma proteína-sensor de uma forma em que um sinal é gerado. Este sinal então inicia uma cascata de transdução que resulta em respostas da célula por meio de alterações na expressão dos genes e/ou na atividade enzimática. As funções metabólicas e de sinalização dos açúcares não são facilmente distinguíveis. As questões relacionadas aos açúcares como sensores e sinalizadores são similares àquelas que envolvem as demais cascatas de transdução de sinais. Ou seja, estão relacionadas em como o açúcar é percebido pela célula, sua interação com sensores moleculares, localização celular e a natureza molecular desses sensores, a transdução do sinal e, finalmente, como a expressão de genes, atividades enzimáticas ou outros processos celulares são alterados.

Em plantas, a sinalização a partir de açúcares é capaz de modular o crescimento, desenvolvimento e resposta ao estresse. Análises genéticas mostraram a interação entre açúcar e sinalização hormonal (Rolland et al., 2006).

Neste contexto, a falta de carbono (Contento et al., 2004; Thimm et al., 2004) e a adição de açúcar (Bläsing *et al.*, 2005; Price *et al.*, 2004; Thum *et al.*, 2004) modificam a expressão de centenas de genes (Rolland *et al.*, 2006). A depleção de carbono induz genes que atuam na gliconeogênese e na mobilização de compostos armazenados (Ho *et al.*, 2001; Koch, 1996; Rylott *et al.*, 2003). Os principais açúcares induzem genes de síntese de polissacarídeos, lipídios e proteínas e reprimem genes relacionados à fotossíntese (Koch, 1996; Paul and Foyer, 2001; Stitt and Krapp, 1999). A glicose e a sacarose encontram-se como os açúcares melhor estudados, atuando como sinalizadores e promovendo mudanças na expressão gênica em plantas (Jang and Shen, 1994).

1.3.1. Sinalização por glicose em plantas

A glicose é uma das moléculas centrais no desempenho de funções de sinalização celular e atua em uma gama enorme de organismos, desde *E. coli* e fungos a humanos e plantas. Os diversos mecanismos moleculares que envolvem sensores e sinalização por glicose, bem como ativação/repressão transcricional mediada por esse açúcar têm sido amplamente estudados em microrganismos unicelulares (Stulke and Hillen, 1999; Johnston and Kim, 2005; Moreno et al., 2005; Santangelo, 2006).

Não obstante o papel essencial desempenhado pela glicose na expressão de genes, na fisiologia, desenvolvimento, metabolismo, proliferação e morte celular, os mecanismos moleculares envolvidos nas vias de sinalização deste açúcar permanecem imprecisos em plantas e animais (Rolland *et al.*, 2006; Danial *et al.*, 2003; Wilson., 2003; Dentin *et al.*, 2004).

Sabe-se que as plantas possuem, pelo menos, três vias de sinalização por glicose (Rolland *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2000): uma em que a hexoquinase-1 é o sensor e outras duas em que a hexoquinase-1 não está envolvida (independente de hexoquinase 1). Numa

destas duas vias independentes de HXK1, a fosforilação da glicose é necessária (i.e., o metabolismo da glicose é requerido) enquanto a outra é independente da fosforilação da glicose (Zhou et al., 1998; Cheng et al., 2002; Rolland et al., 2002; León and Sheen, 2003; Yanagisawa et al., 2003; Gibson, 2004; Osuna et al, 2007) (Figura 3). Dessa forma, notamos que a HXK1 não apenas catalisa a fosforilação dependente de ATP da glicose, mas também atua como sensor dos níveis de glicose e como sensor do status de fosforilação da glicose, transmitindo esta informação ao núcleo através de uma via de transdução. Através da análise de mutantes gin2 (glucose insensitive2), deficiente na codificação do gene da HXK1, foi possível separar as atividades catalíticas e de sensibilidade ao sinal glicose apresentados por esta enzima (Moore et al., 2003). Em Arabidopsis thaliana existem dois genes de HXK e quatro genes HXK-like, que interagem não apenas entre eles para a formação de dímeros, mas também com outras proteínas e com várias membranas celulares (Frommer et al., 2003). As isoformas de HXK têm sido encontradas no citoplasma celular, em associação com o retículo endoplasmático e com a membrana plasmática, mas também podem ser localizadas na membrana externa e no estroma do cloroplasto, no núcleo e em mitocôndrias (Travis et al., 1999; Giese et al., 2005), Nesta última organela, recentemente HXK foi relacionada com a regulação de morte celular programada, dando indícios da ligação entre o metabolismo da glicose e apoptose (Kim et al., 2006). Cho et al. (2006) apresentaram evidências que HXK1 forma complexos apenas no núcleo com VHA-B1 (vacuolar H⁺-ATPase B1) e com RPT5B (uma partícula 19S da subunidade proteossômica), para interagir com o promotor do gene CAB2, reprimindo sua expressão em resposta a glicose.

Análises genéticas em *Arabidopsis thaliana* evidenciaram uma interação entre a sinalização por glicose e ABA, e glicose e etileno (Rook et al., 2006; Price et al., 2004), indicando a existência de uma complexa rede de interação entre glicose e hormônios.

Análises recentes das mudanças globais da transcrição em resposta a glicose usando a tecnologia de microarranjos de DNA em *Arabidopsis thaliana* confirmaram a interação da sinalização da glicose com outros hormônios e permitiu identificar genes de sinalização (fatores de transrição, fosfatases, quinases) possivelmente envolvidos nos processos de regulação desencadeados pela glicose (Price et al., 2004; Li et al., 2006). O modelo de via de sinalização por glicose em plantas apresentado na figura 3 mostra o hormônio ABA como mediador do sinal glicose e o etileno como regulador antagônico na sinalização por este açúcar.



Figura 3. Modelo das interações genéticas entre açúcar e sinalização hormonal. A sinalização de glicose dependente de HXK1, que controla o desenvolvimento de plântulas e induz a biossíntese e a sinalização de ABA. As sinalizações de glicose e etileno convergem em CTR1, homólogo a *gin4* e *sis1*, e no fato de glicose promover a instabilidade da proteína fator de transcrição EIN3 (*ethylene insensitive3*). Finalmente, a via de sinalização de glicose mediada por Hxk1 interage positiva e negativamente com auxina e citocinina, respectivamente (adaptado de Rolland *et al.*, 2006).

1.3.2. Sinalização por sacarose em plantas

A sacarose é o principal carboidrato transportado nas plantas, no entanto, apenas mais recentemente surgiram evidências do papel deste açúcar como sinalizador molecular. Hoje está bem estabelecido que a sinalização por este açúcar é realizada por vias independentes da HXK1. Tais vias ainda não são conhecidas, porém alguns transportadores de sacarose poderiam atuar como receptores (Choiu and Bush, 1998). Possivelmente, algumas SNFs quinases também estão envolvidas nessa via de sinalização (Purcell et al., 1998; Tiessen et al., 2003).

Sabe-se também que a sacarose atua como regulador específico na transcrição de alguns genes, como patatina de batata (atividade de lipase e de estocagem de proteínas) (Jefferson et al., 1990; Wenzler et al., 1989) e o promotor rolC floema-específico de *Agrobacterium rhizogenes* (Yokoyama et al., 1994), genes esses não regulados na presença dos produtos de quebra da sacarose, glicose e frutose (Wezler et al., 1989; Jefferson et al., 1990; Yokoyama et al., 1994; Ciereszko et al., 2001). A sacarose reprime um gene transportador de sacarose do tipo próton-simporte em beterraba (Chiou e Bush, 1998). Experimentos com análogos não metabolizáveis da sacarose, como palatinose e turanose mostraram sinalização independente de metabolismo: os genes do transportador de hexose VvHT1 em videira, da α -amilase no embrião de cevada e de ADP-glicose pirofosforilase em batata têm sua expressão afetada na presença desses análogos (Loreti et al 2000; Atanassova et al., 2003; Tiessen et al., 2003).

A sacarose também é responsável pela regulação pós transcricional do fator de transcrição *ATB2*. Essa regulação ocorre ao nível da tradução: elevadas concentrações de sacarose reprimem a tradução do RNAm de *ATB2* (Wiese et al., 2004). Assim, o fator de transcrição *ATB2* é o primeiro gene conhecido cuja tradução é reprimida. Este fator de transcrição ainda está envolvido na integração entre os metabolismos de carbono e

nitrogênio, através da regulação dos genes ASN1 (Asparagina sintetase 1), enzima que sintetiza asparagina e glutamato, e ProDH2 (prolina desidrogenase), que degrada prolina, ambos negativamente regulados pela sacarose. Asparagina e glutamina servem como carregadores de nitrogênio nas plantas (Sieciechowicz, 1998), estabelecendo assim uma ligação do fator de transcrição *ATB2* de *Arabidopsis thaliana* na sinalização por açúcar, níveis de aminoácidos e utilização de nitrogênio em plantas (Hanson et al., 2007).

1.4. Histórico e importância econômica da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à tribo Andropogoneae, da família Gramineae (Poaceae). Pertence ao gênero *Saccharum* formado por híbridos (G. Arceneaux, 1967; S. Price, 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 nos 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, 2001).

A cana-de-açúcar é uma das mais importantes espécies vegetais cultivadas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, com uma área maior que 6 milhões de hectares e 101 países (FAO 2005; http://apps.fao.org). O Brasil é o maior produtor, participando com 25% da produção. Desde os tempos do Brasil colônia até os dias atuais, a cultura da cana-de-açúcar tem sido uma grande fonte de riquezas para o nosso país, contribuindo para o seu crescimento. Neste começo do século XXI, o Brasil se consolidou como o maior produtor mundial de açúcar de cana e a produção esperada de cana-de-açúcar para este ano é de 588 milhões de toneladas, quantidade 14% maior que a de 2007, que foi de 515,3 milhões de toneladas (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE).

A importância econômica desta cultura é grande, visto que é uma fonte de matéria prima para a produção de açúcar para consumo humano, álcool como fonte de bioenergia e biomassa para a alimentação animal. Historicamente, a agroindústria da cana-de-açúcar imprimiu sua contribuição de forma marcante não apenas na economia do país, mas também nas áreas: 1) social- através da geração de empregos no campo e nas cidades, 2) estratégica- 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 tradicional gasolina. O sucesso dessa cultura provém do crescente consumo de açúcar e álcool (etanol), sendo o estado de São Paulo responsável por 60% da safra brasileira (Pessoa-Jr et al, 2005).

Além do açúcar e do álcool, há uma variedade muito maior de produtos que podem ser obtidos a partir da cana-de-açúcar. O bagaço da cana 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 açúcar fermentáveis para a produção de bioetanol (ou etanol celulósico).

A utilização de variedades melhoradas geneticamente constitui a principal estratégia para alcançar o aumento da produtividade. Devido a sua origem interespecífica, a cana-de-açúcar possui um dos mais complexos genomas vegetais, apresentando um variável nível de ploidia e aneuploidia. Seu genoma completo ainda não está disponível e a seleção por intercruzamento visando a obtenção de variedades de cana-de-açúcar mais produtivas, resistentes a pragas e doenças e adaptadas a ambientes diversos, é um processo bastante lento, cuja finalização pode levar de 12 a 15 anos. Esse processo pode ser

efetivamente abreviado com o uso de marcadores moleculares para identificar lócus QTL envolvidos no controle de características desejáveis, durante as fases iniciais do programa de melhoramento (Burnquist, 2000). A identificação de genes responsáveis por qualidades agronomicamente desejáveis e sua posterior manipulação por meio de técnicas de biologia molecular podem proporcionar a obtenção de variedades bem sucedidas, reduzindo drasticamente as perdas na agricultura. 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.

Dessa forma, ao se acelerar o ritmo do melhoramento, identificando uma grande quantidade de novos genes que podem ser utilizados de forma dirigida para produzir variedades mais produtivas, melhor adaptadas a diferentes tipos de solo e clima e mais resistentes a pragas e doença, será possível aumentar a produtividade e diminuir as perdas para o agricultor e para o país.

1.5. Os projetos SUCEST e SUCAST

Os projetos genoma de plantas, animais e microrganismos têm permitido amplo acesso à informação sobre o conteúdo em genes e a estrutura do genoma. Por outro lado, os projetos ESTs (*Expressed Sequence Tags*) revelam quais são os genes expressos em um tecido ou órgão, em uma dada situação fisiológica ou patológica, uma vez que as seqüências de DNA destes projetos representam trechos de mRNA. Existem inúmeros trabalhos nacionais e internacionais, juntando esforços, para desenvolver um catálogo de ESTs das principais plantas cultiváveis, incluindo a cana-de-açúcar.

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. O banco de dados GeneBank para cana-de-açúcar (Março 15, 2008) lista mais de 262.000 seqüências ESTs e 15.500 genes únicos de 26 bibliotecas de cDNA construídas a partir de 11 tecidos em diferentes estágios de desenvolvimento (Vettore et al., 2003). 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 (2003) 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 sinal celular, bioenergética e respostas por 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.

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).

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.

1.6. Acúmulo de sacarose e sinalização por açúcares

Os cultivares de cana-de-açúcar diferem no que diz respeito à capacidade de acúmulo de sacarose e à dinâmica desse acúmulo durante o crescimento da planta (Lingle, 1997). Dados já publicados mostraram diferenças no perfil de expressão gênica entre entrenós imaturos, que não estocam sacarose e entrenós maduros, que estocam sacarose (Carson and Botha 2002). Os entrenós maduros de cana chegam a apresentar até 42% do peso seco do colmo em sacarose, enquanto que nos entrenós imaturos, uma pequena quantidade de sacarose é observada. Um dos principais objetivos do programas de melhoramento genético visa promover a formação de genótipos que produzam maior quantidade de sacarose que pode ser medido em campo determinando um valor denominado Brix (conteúdo de sólido solúvel). Alto e baixo Brix significam, respectivamente, alto e baixo teor de sacarose presente no colmo. Com o intuito de identificar genes candidatos envolvidos possivelmente no controle do acúmulo de sacarose no colmo, a expressão dos genes do catálogo SUCAST foi avaliada em genótipos contrastantes para o teor de sacarose (alto Brix versus baixo Brix) e em entrenós maduros (que acumulam mais sacarose) em relação a entrenós imaturos (que acumulam menos

sacarose). Foram identificados uma série de genes associados ao acúmulo de sacarose em genótipos alto Brix e em entrenós maduros (Felix, 2006; Souza et al, 2007).

Genes diferencialmente expressos nos genótipos contrastantes para teor de sacarose e que também estão envolvidos na cascata de regulação ativada por carboidratos poderiam fornecer novas informações sobre a importância dos elementos de sinalização por acúcares e acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar.

1.7. Evolução das Angiospermas

As angiospermas originaram-se há aproximadamente 200 milhões de anos (Wolfe et al, 1989; Wikstrom et al, 2001) e, subseqüentemente, divergiram-se em linhagens que acabaram formando, aproximadamente, 250.000 espécies conhecidas atualmente (Wikstrom et al, 2001). Uma série de diversidades metabólicas, morfológicas e de desenvolvimento acompanhou as angiospermas no sentido de adaptações ambientais. Dentro das monocotiledôneas, a família das gramíneas (Poaceae), que surgiu há, aproximadamente, 60 milhões de anos (Kellog, 2001) inclui importantes espécies cultivadas, como arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e cana-de-açúcar. A comparação entre genomas permite revelar alguns aspectos da base genética responsável pela diversidade encontrada entre as espécies de angiospermas. Nesse sentido, as seqüências genômicas de duas espécies de plantas modelo como a eudicotiledônea *Arabidopsis thaliana* (família Brassicaceae; Arabidopsis Genome Initiative, 2000) e a monocotiledônea arroz (família Poaceae; Feng et al, 2002; Goff et al, 2002; Sasaki et al, 2002, Yu et al, 2002) devem ter um profundo impacto na genética de plantas e no nosso entendimento a cerca da evolução das plantas (Somerville & Somerville, 1999; Poethig, 2001).

Em cana-de-açúcar, por exemplo, o grande número de SASs que foram produzidos, também nos possibilita um maior entendimento a cerca do processo de evolução das

angiospermas. Uma comparação entre os diversos SASs e o DNA ou proteínas de outras angiospermas confirmou que a perda de genes linhagem-específicos, altas taxas de evolução em seqüências específicas e *splicings* alternativos de éxons são importantes processos envolvidos na divergência das angiospermas (Vincentz et al, 2004).

Análises comparativas dos genes regulados por açúcares a curto prazo entre linhagens evolutivas distantes de angiospermas (monocotiledôneas versus eudicotiledôneas) podem representar uma abordagem para revelar os elementos conservados e específicos da vias de sinalização dos açúcares. Adicionamos a isso o fato de que elementos de sinalização rápida por açúcar conservados entre cana-de-açúcar e Arabidopsis thaliana podem ser excelentes candidatos a estudos funcionais mais apurados, já que conservaram sua regulação por açúcar ao longo da evolução. Dentro desta perspectiva, estabelecemos um esquema experimental para identificar os genes diferencialmente expressos em cana em resposta a glicose e/ou sacarose, e comparar esta regulação com a regulação por glicose e/ou sacarose apresentada por seus genes ortólogos em Arabidopsis thaliana.

Dessa forma, genes diferencialmente expressos em tratamentos com estes dois açúcares em cana-de-açúcar quando comparados com genes ortólogos também diferencialmente expressos sob essas condições em *Arabidopsis thaliana*, podem nos fornecer importantes dados a cerca da evolução de vias de transdução de sinais entre esses representantes de mono e dicotiledônea, bem como elucidar certos aspectos das vias de sinalização desses açúcares em cana-de-açúcar.
1.8. Grupos de ortólogos

Duplicação gênica é um processo essencial na diversificação e adaptação de organismos durante o processo de evolução, uma vez que genes duplicados representam adição de variabilidade sob a qual agem forças evolutivas, como mutação e seleção natural, que podem levar ao surgimento de novas funções (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000; Lawton-Rauh, 2003; Vandepoele *et al.*, 2003; Kellis *et al.*, 2004). A obtenção de novas cópias gênicas por recombinação não homóloga e/ou por duplicação de segmentos genômicos ou mesmo de genomas inteiros são mecanismos que levam à formação de famílias multigênicas (Wendel, 2000; Bennetzen, 2002; Kellis *et al.*, 2004). Estes mecanismos vêm contribuindo evolutivamente para moldar o formato atual dos genomas eucarióticos conhecidos (Lespinet *et al.*, 2002; Lynch, 2002). Este fato pode ser ilustrado pelo genoma de *Arabidopsis thaliana*, onde as famílias multigênicas correspondem a 65% do seu genoma (Wendel, 2000).

Um gene duplicado apresenta, inicialmente, redundância funcional em relação ao gene do qual se originou. A partir deste ponto, quatro podem ser os destinos destas duas cópias (Figura 4). Primeiramente ambas as cópias podem manter a função original sendo completamente redundantes (redundância funcional). Segundo, as cópias podem evoluir para um estado onde a função que era desempenhada pelo gene ancestral passa a ser desempenhada pela ação conjunta de ambas as cópias (subfuncionalização). Terceiro, uma cópia pode manter a função ancestral enquanto a outra diverge funcionalmente a ponto de desempenhar uma nova função ou mesmo não participar mais do processo original. E, por último, o acumulo de mutações pode tornar uma das cópias um pseudogene, que consiste em uma seqüência inativa de DNA genômico que apresenta similaridade e está evolutivamente relacionada a homólogos funcionais. (Lawton-Rauh, 2003).



Figura 4. Possíveis destinos de genes duplicados segundo uma trajetória temporal. Após a duplicação, as duas cópias geradas apresentam redundância funcional que pode se manter ao longo da evolução, ou pode haver subfuncionalização, neofuncionalização ou formação de um pseudogene. (Figura modificada de Lawton-Rauh, 2003).

Até o momento 86 espécies de Eucariotos tiveram seu genoma completamente seqüenciado (http://www.genomesonline.org/). No reino Viridiplantae (Embryophyta + completos Chlorophyta) 13 genomas foram seqüenciados: as angiospermas eudicotiledôneas Arabidopsis thaliana (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), Populus trichocarpa (Tuskan et al. 2006), Vitis vinifera (Jaillon et al., 2007) e Glycine max (soja) (2008,preliminar - http://phyto3.phytozome.net/soybean.php), angiospermas as monocotiledôneas Oryza sativa (arroz) (Goff et al., 2002) e Sorghum bicolor (sorgo) (Paterson, 2008), a lycophyta Selaginella moellendorffii (2007, http://selaginella .genomics.purdue.edu), a bryophyta *Physcomitrella patens* (Rensing et al., 2008) e as algas verdes Ostreococcus lucimarinus (Palenik et al., 2007), Ostreococcus tauri (Derelle et al., 2006), Chlamydomonas reinhardtii (Merchant et al., 2007), Micromonas pusilla (2008, http://genome.jgi-psf.org/MinpuC2/MicpuC2.info.html) Volvox (2007,e carteri http://genome.jgi-psf.org/Volca1/ Volca1.info.html). O acesso a esta grande quantidade de dados permite explorar comparativamente as bases genéticas da diversidade dentro da linhagem das plantas (Figura 5) (Hedges et al., 2004; Chase & Fay, 2001). Um dos aspectos da abordagem comparativa envolve o estabelecimento de relações entre genes de diferentes genomas, em um sistema de genes homólogos, que inclui genes ortólogos e parálogos (Bennetzen, 2002; Pennacchio, 2003; Vincentz et al., 2004). O termo ortólogo refere-se a genes homólogos que divergiram a partir de um evento de especiação, tendo todos se originados de uma cópia ancestral existente no ancestral comum entre as espécies que os contém, e parálogos são genes homólogos que resultaram de um evento de duplicação dentro de um genoma (Tatusov et al., 1997; Thornton & DeSalle, 2000; Fitch, 2000; Meyerowitz, 2002).



Figura 5. Representação das relações evolutivas de ortologia e paralogia entre genes. Um gene ancestral M sofre uma duplicação (D) originando os parálogos M1 e M2 no genoma da espécie ancestral. Um evento de especiação (E) gera dois grupos de ortólogos, M1 e M2 nas espécies I e II. Na espécie II, M2'' e M3 são parálogos gerados por uma duplicação que ocorreu depois da separação entre as espécies I e II.

As relações de ortologia entre genes de famílias multigênicas podem ser avaliadas através da definição de grupos de genes ortólogos. Um grupo de ortólogos é assumido como sendo o resultado da evolução de um gene ancestral através de eventos de especiação e duplicação. Considerando que todos os genes dentro de um mesmo grupo de ortólogos possuem uma mesma origem ancestral, a delimitação de um grupo deve facilitar a transferência de informações bioquímicas, estruturais e funcionais de uma proteína para outra dentro de um mesmo grupo (Tatusov *et al.*, 1997). Esta abordagem otimiza a análise funcional de proteínas cujas funções ainda são desconhecidas. Grupos de ortólogos de volução e de duplicação (Henikoff *et al.*, 1997).

1.9. A tecnologia dos microarranjos

A manutenção, propagação e evolução da vida nos diferentes organismos dependem de uma complexa rede de interações bioquímicas entre os genes e seus produtos- RNA e proteínas. Os estudos tradicionais em biologia molecular até recentemente estavam normalmente restritos a análises pontuais que impediam uma visão abrangente do funcionamento sincronizado dos genes. As metodologias mais 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; Blohm e Guiseppi-Elie, 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 and Butow, 2000; Schaffer et al, 2000). Microarrays como os chips da empresa Affymetrix permitiram a análise da expressão do genoma inteiro de Arabidopsis thaliana (Zhu, 2003).

Análises de *microarrays* de DNA foram utilizadas para avaliar efeitos dos açúcares (sozinhos ou interagindo com outros sinais) na expressão de genes em plântulas de *Arabidopsis thaliana* (Price et al., 2004 e Thum et al., 2004). Assim, mudanças nas taxas transcricionais podem tomar lugar em um tipo de célula ou tecido, bem como determinadas condições de doenças podem ser medidas durante seu desenvolvimento ou em resposta a um tratamento. Através do padrão de respostas apresentado por um determinado gene, podemos atribuir funções a ele ou colocá-lo em um determinado grupo funcional, descobrindo assim sua possível via de atuação em um mecanismo global.

Os chips são confeccionados por máquinas robotizadas que trabalham em alta velocidade e precisão. Em um experimento de microarranjo, ocorre a hibridização de alvos fluorescentes provenientes de duas amostras de RNA sobre os arranjos de DNA, que podem ser constituídos por produtos purificados de PCR, DNA plasmidial ou seqüências de oligonucleotídeos, por exemplo. Para a obtenção desses alvos, parte-se de RNA total ou RNA mensageiro, que serve de molde para síntese de cDNA marcado com fluoróforos (Cy3 e Cy5, por exemplo). Ambos os alvos são hibridizados competitivamente em uma mesma lâmina. Pelo fato do DNA no suporte estar em excesso, a quantidade de alvo hibridizado ao DNA serve como medida da abundância do transcrito em uma população de mRNA. Dessa maneira, pode-se determinar o padrão de expressão de um determinado gene ou EST, comparando-se a intensidade do seu sinal nos diversos tratamentos.

2. Objetivos

2.1. Gerais

Inferir o grau de diversificação das vias de transdução de sinais por sacarose e glicose através da análise de uma monocotiledônea (*Saccharum* sp) e uma dicotiledônea (*Arabidopsis thaliana*).

2.2. Específicos

2.2a Identificação de genes participantes de vias de transdução de sinal que sejam diferencialmente expressos a partir dos tratamentos com glicose e sacarose em cana-de-açúcar.

2.2b Realização de uma análise comparativa dos genes de resposta à glicose e sacarose em *Saccharum* sp e *Arabidopsis thaliana*.

2.2c Melhor entendimento das vias de sinalização desses açúcares em cana-deaçúcar em curto prazo e se essa sinalização rápida está relacionada ao controle do acúmulo de sacarose.

3. Material e Métodos

3.1. 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., 2003) 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. A tabela 1 mostra o número de SAS para cada uma das categorias presentes do microarranjo. Tabela 1. Categorias presentes nos microarranjos SUCAST.

<u>Classificação SUCAST</u>	# SAS	Microarranjos
Categorias de proteínas		
Receptores	481	231
Adaptadores	12	9
Poteínas G	17	8
Pequenas GTPases	74	36
Sistema de duplo componente	20	11
Ciclase	1	
Metabolismo de Cálcio	69	30
Metabolismo de Inositol	46	20
Proteínas fosfatases	108	41
Proteínas quinases	508	235
Ubiquitinação	107	43
Fatores de transcrição	616	179
Biossíntese de hormônios	75	31
Proteínas relacionadas a vias de hormônios	22	13
<u>Categorias funcionais</u>		
Desenvolvimento	33	18
Ciclo Celular	34	11
Estresse	307	119
Patogenicidade	384	112
Proteínas desconhecidas e genes sem similaridades		
nos bancos de dados (no matches)		295
"No matches"	416	
Proteínas desconecidas	139	
*Outros	52	103
Total		1545

A primeira coluna mostra as categorias do catálogo SUCAST. A segunda coluna mostra o número de SAS para as categorias que compõem o Catálogo SUCAST A terceira coluna mostra o número de SAS presentes, em cada uma das categorias, no chip utilizado.

3.2. Material biológico e condições de cultivo

As sementes de cana-de-açúcar utilizadas, tanto para as amostras para experimentos de microarranjos quanto para as amostras de PCR em tempo real, foram cedidas pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba-Brasil) e são provenientes do cruzamento entre as variedades SP891046 vs IAC912195.

Para fins de esterilização, as sementes foram, inicialmente, deixadas a uma temperatura de 52°C por 10 minutos e posteriormente, tratadas com etanol 70% por 5 minutos, hipoclorito de sódio 40% por 20 minutos e cinco lavagens com água MilliQ estéril.

A germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas foram realizados *in vitro* em meio de cultura MS/2 sólido (Murashige and Skoog, 1962), correspondente a 2,1g/l de sais MS (MS salt mixture, Invitrogen), acrescido de 4,4ml/l de tampão MES 3mM pH 5,7 (Invitrogen) e ajustado a 0,5% de sacarose (Labsynth), 0,55% de agar (Agar Type E, Sigma) e antibiótico timentin (1ul/ml-300mg/ml), para se evitar contaminação bacteriana do meio de cultura. As plântulas fora cultivadas num período de 12 dias e, então, transplantadas para meio de cultura MS/2 líquido (semelhante ao meio sólido acima descrito, contudo sem ágar acrescido), onde permaneceram por 24 horas na ausência de açúcar e sob agitação contínua de 100 rpm (ver figura 6). Ambas as condições de cultivo foram submetidas a uma câmara de germinação à temperatura de 28°C e sob luz contínua de baixa intensidade (lâmpadas fluorescente luz do dia e grolux, Silvania). Após esse período de 24 horas, foram realizados os tratamentos.





Figura 6. Plântulas de cana-de-açúcar em meio de cultura com idade de 13 dias. As figuras A, B e C mostram as plântulas em meio de cultura sólido antes de serem coletadas e transferidas ao meio de cultura líquido (figuras D e E), onde foi feito o tratamento com os açúcares. A figura F mostra os recipientes no shaker, onde as plântulas permaneceram sob agitação constante de 100 rpm.

3.3. Tratamentos

Ao final de 24 horas em meio líquido, partiu-se de uma solução estoque de glicose (Labsynth) 30%, esterilizada por filtração e que foi adicionada às culturas em meio líquido em uma concentração final de 3%. No experimento controle foi adicionado o mesmo volume de água. Após 4 horas de tratamento, as plântulas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Seguindo o mesmo protocolo acima descrito, foram feitos experimentos com manitol (D-mannitol, Sigma), como controle do efeito osmótico e com sacarose (Labsynth), para também se verificar a resposta de genes ao tratamento com este açúcar.

3.4. Extração e análise do RNA total

Amostras de plântulas inteiras (aproximadamente 5g) foram pesadas e pulverizadas a pó fino, em nitrogênio líquido, usando-se cadinho e pistilo previamente resfriados. O pó foi transferido para um tubo de 50 mL e homogeneizado com 15 mL do reagente RNA Concert® (Invitrogen, USA), de acordo com procedimento recomendado pelo fabricante. Os pellets de RNA foram ressuspendidos em 100 μ L de água DEPC (Dietilpirofosfato, USB) morna (previamente aquecida a 65°C), vortexando-se gentilmente no decorrer de 15 minutos. Sua quantificação foi obtida mediante a leitura de uma alíquota de 1 μ L de RNA da amostra diluída em 99 μ L de água DEPC no GeneQuant Spectrophotometer (Amershan Pharmacia). 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 μ L), foram adicionados 2 μ L de água DEPC e 3 μ L 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. Os experimentos e análises a seguir, referentes à purificação do RNA total, síntese, marcação e hibridização do cDNA, extração dos dados e análises estatísticas foram feitos em colaboração com o Laboratório de Transdução de Sinal, da Dra. Glaúcia Mendes Souza (IQ-USP).

3.5. Purificação do RNA Total para os ensaios de microrranjos

Para a purificação do RNA total, utilizou-se o RNAeasy Mini Protocol for RNA Clean up (Qiagen). Foi utilizado um total de 60 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 Beta-mercapto-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 10.000 rpm 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 10.000 rpm e o líquido coletado descartado. Adicionou-se então, 500 µL de tampão RPE à mini coluna, centrifugou-se por 2 minutos a 10.000 rpm 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 10.000 rpm 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.

3.6. Síntese e marcação do cDNA

Para a síntese e marcação dos alvos de cDNA, utilizou-se o SuperScriptTM Plus Indirect cDNA Labeling System (Invitrogen, USA). A reação de anelamento dos primers ao molde de RNA foi realizada com 15 μ g do RNA purificado, 2 μ L de oligo-DT ancorado (2,5 μ g/ μ L) e água milli-Q tratada com DEPC em volume suficiente para completar o volume de reação para 17 μ L. As amostras foram então incubadas a 70°C por 5 minutos e deixadas esfriar por 1 minuto em gelo.

Para a reação de transcrição reversa, foi preparado um Mix que continha, por reação, 6 μ L de 5x First Strand buffer, 1,5 μ L de DTT 0,1M, 1,5 μ L da mistura de nucletídeos, 1,0 μ L de RNaseOUTTM (40U/ μ L) e 2 μ L de SuperScriptTM III (400U/ μ L). Todos esses reagentes são fornecidos com o SuperScriptTM Plus Indirect cDNA Labeling System (Invitrogen, USA). Em cada amostra foram adicionados 12 μ L do Mix, num volume final de 29 μ L por tubo. As reações foram então incubadas a 42°C por 3 horas.

Imediatamente após a síntese de cDNA, foi realizada uma reação de hidrólise para a degradação do RNA original através da adição de 15 μ L de NaOH 1N em cada tubo e incubação por 10 minutos a 70°C e posterior adição de 15 μ L de HCl 1N para a neutralização do pH.

O cDNA sintetizado foi purificado com o módulo de purificação do SuperScriptTM. Primeiramente, adicionou-se por tubo contendo o cDNA, 700 μ L de Binding Buffer (previamente preparado com isopropanol). O volume total foi aplicado em uma coluna de purificação ligada a um tubo coletor e centrifugado a 3.300 rpm por 1 minuto. Descartouse o líquido coletado e à coluna de purificação foram adicionados 600 μ L de Whash Buffer (previamente preparado com Etanol). As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm por 30 segundos e o líquido coletado foi descartado. Uma nova centrifugação a 13.000 rpm foi feita para se eliminar o excesso de tampão da coluna. Em um novo tubo coletor procedeu-se a eluição adicionando-se à coluna 30 μ L de água DEPC e centrifugando-se a 13.000 rpm por 1 minuto. O processo de eluição foi repetido acumulando-se um volume total de 60 μ L contendo o cDNA purificado, que foi então totalmente seco em speed-vac a 30°C.

Posteriormente, foi realizada a marcação com os fluoróforos Alexa Fluor® 555 e Alexa Fluor® 647 (60 µg/reação). A partir deste ponto, todos os procedimentos foram realizados sem a incidência de luz direta. O cDNA aminoalil purificado e seco foi ressuspendido em 3 µL de água DEPC e às amostras foram adicionados 5 µL de 2x Coupling Buffer. Foram adicionados 2 µL do solvente orgânico DMSO diretamente ao tubo contendo o fluoróforo Alexa Fluor®. Esta solução foi então adicionada ao tubo contendo o cDNA ressupendido e o tampão, a reação foi vortexada rapidamente e incubada à temperatura ambiente, no escuro, por aproximadamente 3 horas. Foram marcados 6 experimentos no total (12 marcações), 2 de glicose, 2 de manitol e 2 de sacarose, cada um deles com o tratamento e seu respectivo controle. Em um experimento o controle era marcado com o Alexa Fluor® 555 e o tratado com Alexa Fluor® 647 e no segundo o controle era marcado com Alexa Fluor® 647 e o tratado com Alexa Fluor® 555, fazendose assim um swap biológico.

Após a marcação dos cDNAs, procedeu-se uma nova purificação com o módulo de purificação do SuperScriptTM, seguindo-se o mesmo protocolo descrito anteriormente. Os alvos marcados foram eluídos num total de 60 μ L de água DEPC e totalmente secos em speed-vac a 30°C.

3.7. Hibridização manual dos alvos marcados nos microarranjos de cDNA

Os alvos marcados e secos foram ressuspendidos com 6,75 µL de água DEPC. O alvo marcado com Alexa Fluor® 555 foi misturado com o marcado com Alexa Fluor® 647, totalizando um volume de 13,5 µL, ao qual foram adicionados 13,5 µL de tampão de hibridização (Microarray Hibridization Buffer- GE Healthcare) e 27 µL de formamida. As soluções foram incubadas a 92°C por 2 minutos e colocadas em gelo. Os 54 µL de solução foram aplicados em das extremidades de uma lâmina do chip SUCAST. Uma lamínula foi colocada por cima da lâmina de vidro e o sistema foi incubado a 42°C por 16 horas. Após a hibridização, a lâmina foi lavada uma vez em 1xSSC (NaCl 0,3 M, citrato de sódio 0,03 M, pH 7), 0,2%SDS, por 10 minutos a 55°C, duas vezes em 0,1 xSSC, 0,2% SDS (10 minutos a 55°C), uma vez em 0,1x SSC por 1 minuto em temperatura ambiente, mergulhada 4x em água milli-Q e seca imediatamente com jato de nitrogênio. A leitura dos sinais foi feita utilizando-se o *scanner* confocal *Generation III Scanner* (GE Healthcare) com voltagem para PMT (tubo fotomultiplicador) de 830 V para ambos os canais. Os arquivos obtidos foram nomeados de acordo com o código de barras das lâminas.

3.8. Extração e análise dos dados

A extração dos dados foi feita no programa *Array Vision* (Imaging Research Inc.) utilizando-se a medida de densidade MTM e subtraindo-se o valor da intensidade de fundo. Foram descartados *pixels* que estavam fora da faixa de +/- 4 MADs (desvios absolutos da mediana). Todos os dados e imagens dos experimentos de comparação entre os experimentos de glicose, sacarose e manitol foram armazenados em um banco de dados local.

A normalização dos valores brutos de intensidades foi realizada pelo algoritmo de LOWESS (Yang *et al.*, 2002). Pontos do microarranjo com baixa intensidade ou com

sinais saturados, bem como pontos visualmente inspecionados quanto à morfologia alterada ou com sujeira foram retirados da análise.

Os dados normalizados foram visualizados em um gráfico do tipo M x S, onde:

M= log₂ (Cy3/Cy5), a razão da expressão no eixo y

 $S = \log_2 [(Cy3/Cy5)/2]$, a intensidade do sinal no eixo x

Sendo que Cy3 e Cy5 correspondem, respectivamente, aos valores normalizados de intensidade para os canais de Cy3 e Cy5 para determinado ponto. Sempre que a amostra referência (controle) foi marcada com Cy3, o cálculo de M foi feito como sendo M= log₂(Cy5/Cy3). Dessa forma, valores negativos de M sempre denotam expressão maior na amostra experimental. Por esse motivo, o valor de M também pode ser escrito como:

$$M = \log_2 (I_E/I_C)$$

Onde I_E e I_C correspondem, respectivamente, aos valores normalizados de intensidade para determinado ponto nas amostras experimental e controle, respectivamente.

A determinação de genes diferencialmente expressos foi feita pelo método HT-self (Vencio & Koide, 2005). Dessa forma, inicialmente, os dados M x S referentes à determinada lâmina foram usados para gerar intervalos de razão dependentes da intensidade, com nível de credibilidade de 80%. Após a definição desses intervalos de razão, os mesmos foram usados para determinar quais são os genes que possuem 60% ou mais de seus pontos-réplica acima ou abaixo desses intervalos.

3.9. Reações de transcrição reversa para PCR em tempo real

Cinco 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 utlizada para a reação de transcrição reversa usando-se o kit First-Strand cDNA Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA). 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.

3.10. 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 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Os primers específicos foram desenhados usando o programa Primer Express 2.0 Software (Applied Biosystems).

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) 600nM, 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.

Para a validação dos dados de expressão gênica dos experimentos de glicose e sacarose, a razão entre a quantidade relativa de determinado gene e o gene de referência (normalizador) foi determinada utilizando-se o método de 2 ^{-ΔΔCT} (Livak & Schmittgen, 2001) com modificações. O nível de expressão normalizado foi calculado como

$$L = 2^{-\Delta CT}$$

Sendo $\Delta C_T = C_T$, $_{alvo} - C_T$, $_{referência}$, para cada experimento. O C_T 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 a tubulina (SCCCRZ1002H03.g) (F= 5'-CGACATTGAGAGGCCCAACT-3'/ R= 5'- GGGAAGCAGTAAGTGATGAGATCA-3'). 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, foram calculadas para os experimentos de tratamentos com glicose e sacarose. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando $P \ge 0.95$.

A tabela 2 mostra as seqüências dos primers utilizados em reações de PCR em tempo real na quantificação da expressão dos genes relacionados ao acúmulo de sacarose e na validação dos genes diferencialmente expressos a partir dos experimentos de microarranjos.

Genes (SAS)	Categoria	Primer Foward	Primer Reverse	
Genes acúmulo sacarose				
SCCCAM1001A03.g	metabolismo de cálcio	5'-GCTCTCTGGTGGTCAGAAGCA-3'	5'-CATCTAGTAGCAGGAGTTTTGGATTCTT-3	
SCRFLR2037F09.g	metabolismo de cálcio	5'-GCAGCGACCGATACAATACAAC-3'	5'-CGACGCACGATGGAAGCT-3'	
SCJFRT1005C11.g	biossíntese	5'-CTCATTGCGAGGTCGATCATC-3'	5'-AATCCGCCCACGTTCAGG-3'	
SCEQRT1024E12.g	Síntese de fenilpropanóides	5'-CTTCCAGGGCACTCCCATT-3'	5'-GAGAACTGCGCGAACATGAG-3'	
SCBGLR1023D05.g	patogenicidade	5'-CAAATCAAGTTGCGCATGTAAAC-3'	5'-TCACAGACCTAGCTCCATACTGGTA-3'	
SCJFRZ2032G01.g	proteína quinase	5'-CGGTAATTCCTCAAAGGATTGC-3'	5'-CCAGCGGTCAGGCAGAAG-3'	
SCCCRT2001H11.g	pequena GTPase	5'-GCAGAAACGGAGCCATGGT-3'	5'-GCCAAATTTCAGCGAAACGA-3'	
SCCCLR2C01F06.g	estresse	5'-CACCAACCAGAGCGCAAAT-3'	5'-GCGGCCATCTATGTATCTGCTT-3'	
SCJLHR1028C12.g	metabolismo de DNA	5'-AACTGGTTGATTTGTCATGTTGTGT-3'	5'-TTCGTCATCCATTCCAATTCC-3'	
SCCCRZ1001G10.g	fator de transcrição	5'-TCCACCAGCTTGCTCTCGTT-3'	5'-TCAGCTCCTTCACCATTGGAA-3'	
SCCCRT1001E01.g	biossíntese de hormônio	5'-CGTGTCGTTGGCGAAGAAG-3'	5'-CGTCGCCAACTCATGGATCT-3'	
SCBFSB1046D04.g	proteína quinase	5'-GGAGGTATTTCCACCAACTGGTT-3'	5'-TTCAAGTCGCGATGGTAAACAC-3'	
SCMCRT2103B04.g	proteína quinase	5'-TCTTGCTCTTCTTGCTCCCATT-3'	5'-TGCTCTTGCCTCGCTGTTG-3'	
SCCCLR1C05B07.g	proteína quinase	5'-CAGCCTTGATTGTGGTTTCCA-3'	5'-AGCTTATTGGCGTGTTGTTTAGTTT-3'	
SCEPRZ1009C10.g	proteína quinase	5'-TCAGAGCAAACAACCGAAGAAAT-3'	5'-GCCATAGCCTGATCTCAATGATT-3'	
SCACLR2007G02.g	proteína quinase	5'-TCCGGGCCTCCTGTATGA-3'	5'-GCCGGTGGACATGAATGC-3'	
SCRFLR1034G06.g	proteína quinase	5'-CGAACCCTGAGCAACGGATA-3'	5'-CAATGGGCAGGTTCTTCAAGA-3'	
SCEPRZ1010E06.g	proteína fosfatase	5'-CGTCTTCTAGCCTCTGGAAACAC-3'	5'-AGACAGCAGAGGTGGACATGAA-3'	
SCEZHR1088E02.g	proteína fosfatase	5'-CAGCTGGTCAAGAAAACCATCA-3'	5'-GATGCATTAGAAGCTTTGAAGGAGAT-3'	
SCQGLR1085F11.g	estresse	5'-TCACACCACACAAAAGTGGAAA-3'	5'-GCCATGAATAAGTGTCCCTATCCT-3'	
SCCCLR1024E11.g	estresse	5'-TGTCAAGGGCACCATCTTCTTT-3'	5'-GAGGCCAGAGATACTTCCAGTCA-3'	
SCCCRZ1001H05.g	fator de transcrição	5'-CATCCTGCTGCTTTTACTCCATT-3'	5'-AGGGATCGGAGCACTTTTGTT-3'	
SCAGLR1021G10.g	fator de transcrição	5'-CTTGACCTGAAGCAAATCAACAAC-3'	5'-ATCATCAGGTGGTGCATTTCC-3'	
SCCCLR2003E10.g	fator de transcrição	5'-CATCTTCTCCCACTCGTTCTTCTT-3'	5'-AGGGATCGCTCAGCTGGAT-3'	
Validações microarranjos				
SCCCAM1001A03.g	metabolismo de cálcio	5'-GCTCTCTGGTGGTCAGAAGCA-3'	5'-CATCTAGTAGCAGGAGTTTTGGATTCTT-3	
SCCCRZ3002D03.g	fator de transcrição	5'-CCAAGCTCCCTGTCCTCTTG-3'	5'-CGCCAACTACAACTCCTTCGA-3'	
SCSBST3096H04.g	metabolismo de inositol	5'-TGGGTTTATCTGGGCTGATCTT-3'	5'-ACCGCCCTGTTGCAATGT-3'	
SCCCLR1077F09.g	dois componentes	5'-GCGGACGGAGGTCGAAA-3'	5'-TCACCGTCCTCCAAATCCA-3'	
Normalizador	-			
SCCCRZ1002H03.g	tubulina	5'-CGACATTGAGAGGCCCAACT-3'	5'-GGGAAGCAGTAAGTGATGAGATCA-3'	

Tabela 2. Primers utilizados nos experimentos de <u>qRT-PCR</u>.

Identificação dos SAS, categorias nas quais estão incluídos e as seqüências foward e reverse dos primers utilizados para os experimentos com os açúcares sacarose, glicose e manitol nas reações de PCR em tempo real

3.11. Análise comparativa entre as seqüências de cana-de-açúcar e Arabidopsis thaliana

A análise comparativa dos SASs responsivos a acúcar foi feita a partir da construção de árvores filogenéticas contendo as seqüências de plantas correspondentes mais similares á seqüência query do SAS de interesse. Foi feita uma busca por tblastx (Altschul et al., 1997) a partir dos SASs regulados por glicose e/ou sacarose contra o proteoma predito de plantas verdes, que inclui 365,187 seqüências de proteínas obtidas dos seguintes genomas (Arabidopsis thaliana, versão 7.0 - www.arabidopsis.org; Populus trichocarpa, versão 1.1 - http://genome.jgi-psf.org/Poptr1 1/Poptr1 1.home.html; Glycine max, versão 0.1 – www.phytozome.net/soybean.php; Oryza sativa, versão 5.0 – www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/pseudomolecules/info.shtml; Sorghum bicolor, versão 1.4 http://genome.jgi-psf.org/Sorbi1/Sorbi1.home.html; Selaginella moellendorffii, versão 1.0 - http://genome.jgi-psf.org/Selmo1/Selmo1.home.html; *Physcomitrella patens patens*, versão 1.1 - http://genome.jgi-psf.org/Phypal 1/Phypal 1.home.html; Volvox carteri, 1.0 – http://genome.jgi-psf.org/Volca1/Volca1.home.html; Chlamydomonas versão reinhardtii, versão 3.0 - http://genome.jgi-psf.org/chlre3/chlre3 .home.html; Ostreococcus versão 2.0 – http://genome.jgi-psf.org /Ost9901 3/Ost9901 3.html; lucimarinus, Ostreococcus tauri, versão 2.0 – http://genome.jgi-psf.org/Ostta4/Ostta4.home.html; Micromonas pusilla *CCMP1545*, versão 2.0 http://genome.jgipsf.org/MicpuC2/MicpuC2.home.html; Micromonas strain RCC299, versão 2.0 http://genome.jgi-psf.org/MicpuN2/MicpuN2.home.html). Para cada SAS, foram selecionadas as quarenta seqüências que apresentavam maior similaridade ou todas as següências obtidas através do tblastx guando seu número era menor de guarenta. Os domínios conservados entre as quarenta seqüências selecionadas foram alinhados através do programa ClustalW (Higgins et al., 1994). As relações filogenéticas entre essas

seqüências alinhadas foram feitas através da construção de árvores filogenéticas não enraizadas usando o método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) com distância calculada por p-distance (Nei & Kumar, 2000). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Este processo possibilitou a identificação das prováveis seqüências ortólogas em Arabidopsis do SAS de cana-de-açúcar analisado. Os genes ortólogos e os genes homólogos mais próximos de Arabidopsis (em um clado irmão que inclui, pelo menos, mais duas seqüências de Arabidopsis) foram comparados com o grupo de genes de Arabidopsis regulados por glicose (Li *et al.*, 2006) e/ou sacarose (Osuna *et al.*, 2007) usando o programa VennMaster 0.37.3 (http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/HKestler/vennm/doc.html).

4. Resultados

<u>4.1. RNA</u>

Foram feitas, no total, dezoito extrações de RNA a partir de nove experimentos distintos. Consideramos aqui, cada experimento, um pool de plântulas controle não tratadas e um pool de plântulas tratadas com açúcar 3% por 4 horas, como descrito em M&M. Desta forma, temos três experimentos distintos para cada açúcar: sacarose, glicose e manitol, este último, utilizado como controle osmótico. Para as hibridizações de microarranjos, utilizamos os dois primeiros experimentos de sacarose e o terceiro foi utilizado para a validação de alguns genes por qRT-PCR. No caso dos experimentos de qRT-PCR, foram utilizadas as tréplicas biológicas de RNA para identificação e confirmação dos genes diferencialmente expressos. As amostras em tréplicas de RNA totais obtidas a partir de plântulas de cana-de-açúcar com idade de 13 dias, submetidas a tratamentos com glicose, sacarose, manitol, bem como seus respectivos controles podem ser visualizadas na figura 7.



Figura 7. Análise dos RNAs totais de plântulas de cana-de-açúcar tratadas por diferentes açúcares. Gel denaturante de agarose/fomaldeído 1% mostrando a integridade do RNA extraído em três experimentos distintos, de tratamento de plântulas com Glicose, Sacarose e Manitol. Em cada par de corridas, a primeira amostra é o RNA extraído de plântulas, a partir de uma situação controle (adição de água, 0% de glicose) e a segunda amostra trata-se do RNA extraído de plântulas submetidas a um tratamento de 3% de glicose, 3% de manitol e 3% de sacarose, por 4 horas.

Um importante aspecto para as reações de qRT-PCR foi o estabelecimento de qual gene seria usado como normalizador (referência interna). Para isso, fez-se uma reação de qRT-PCR, na qual foram utilizados RNAs provenientes de amostras tratadas e não tratadas de manitol, sacarose e glicose e analisou-se o comportamento de cinco normalizadores: tubulina, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Poliubiquitina (PUB), ubiquitina (UB) e enzima conjugadora de ubiquitina (UBE2). A figura 8 mostra a variação da expressão destes cinco genes em resposta aos tratamentos por carboidratos.



Figura 8. Variação de resposta dos genes GAPDH, PUB, TUB, UB e UBE2 a tratamento por carboidratos - No eixo das abscissas temos os 6 experimentos distintos testados: G- (experimento controle de glicose-sem glicose adicionada); G+ (experimento tratado com glicose 3%); M- (experimento controle de manitol- sem manitol adicionado); M+ (experimento tratado com manitol 3%); S- (experimento controle de sacarose-sem sacarose adicionada); S+ (experimento tratado com sacarose 3%). 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 8, nenhum desses 5 genes apresentou uma expressão estável em todas as condições, portanto não podem ser considerados normalizadores perfeitos. Foi escolhida a tubulina de cana-de-açúcar, gene que apresentou a expressão menos variável nas diversas condições testadas aqui (Figura 8). Como forma de testar a tubulina como normalizador, alguns genes também foram testados com PUB e apresentaram a mesma resposta quando comparados à tubulina. Foram utilizadas buscas utilizando o algoritmo BLAST contra o banco de dados do SUCEST utilizando as seqüências dos primers utilizados nas reações de qRT-PCR com o intuito de se verificar a especificidade destes. 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.

Em seguida, os resultados serão divididos em duas partes. Na primeira parte, buscamos associar elementos de sinalização rápida por açúcar (considerando quatro horas de tratamento) ao acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar (em genótipos contrastantes para acúmulo de sacarose, alto e baixo Brix, bem como em entrenós maduros, que acumulam mais sacarose em relação a entrenós imaturos). Analisaremos a conservação evolutiva em termos de regulação por sacarose e glicose entre esses elementos de sinalização rápida por açúcar em cana e seus genes evolutivamente relacionados de Arabidopsis. Já na segunda parte, também buscamos elementos de sinalização rápida por açúcar, contudo, num âmbito mais geral, utilizando-se a tecnologia dos microarranjos, a partir de hibridizações feitas no chip SUCAST para avaliar a regulação por sacarose em plântulas de cana-de-açúcar. Da mesma forma que na abordagem da primeira parte, os elementos regulados por sacarose aqui encontrados

terão comparadas suas respostas regulatórias a açúcar à regulação de genes evolutivamente relacionados de Arabidopsis, analisando-se também a conservação evolutiva das redes de sinalização por carboidratos.

4.2. Relação entre genes de reposta rápida a açúcar e acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar

Os genótipos de uma população segregante de cana-de-açúcar diferem com relação à capacidade máxima de acúmulo de sacarose, bem como em relação à dinâmica de acúmulo de sacarose durante o crescimento e desenvolvimento (Lingle, 1997). Os programas de melhoramento promovem cruzamentos no sentido de buscar genótipos que acumulam maior quantidade de sacarose no colmo. O teor de sacarose de diferentes cultivares de cana-de-acúcar pode ser medido em campo determinando um valor denominado Brix (conteúdo de sólido solúvel). Em cana-de-acúcar, a maior parte desse conteúdo corresponde à sacarose (70 a 91%). Alto e baixo Brix significam, respectivamente, alto e baixo teor de sacarose presente no colmo. Dessa forma, a análise de genótipos contrastantes para teor de sacarose permitirá um maior entendimento a cerca de genes relacionados ao acúmulo deste açúcar. Dados já publicados mostraram diferenças na expressão de genes entre entrenós imaturos, que não estocam sacarose e entrenós maduros, que estocam sacarose (Carson & Botha 2002). Neste contexto, para tentarmos elucidar novos aspectos relacionados ao acúmulo de sacarose, nos perguntamos se genes diferencialmente expressos em genótipos contrastantes para acúmulo de sacarose (alto e baixo Brix e entrenó maduro versus imaturo) também seriam regulados em resposta à aplicação dos acúcares sacarose e glicose e, por consequência, fariam parte das vias de sinalização desses carboidratos. Em outras

palavras, pretendíamos avaliar a existência de uma relação entre sinalização por açúcares e acúmulo de sacarose.

Para abordar esta questão, 34 SAS (*Sugarcane Assembled Sequences*), representando 34 mRNAs que se mostraram diferencialmente expressos em genótipos contrastantes para acúmulo de sacarose alto/baixo Brix e entrenó maduro/imaturo, tratando-se assim, de possíveis genes de interesse em termos de acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar, foram selecionados. Além disso, estes genes ainda se mostraram responsivos a tratamentos com hormônios como ABA e Ácido Jasmônico e ainda a condições como seca, deficiência de fosfato, herbivoria e interações com bactérias endofíticas (Papini-Terzi, 2007), constituindo dessa forma, genes de interesse a cerca de crescimento, desenvolvimento e acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar.

Dos 34 genes testados relacionados a acúmulo de sacarose, 30 deles se mostraram diferencialmente expressos após tratamento com sacarose. Para mostrar que tal resposta não era devido à ocorrência de mudança osmótica relacionada à adição de açúcar no meio, analisamos a regulação desses 30 genes em resposta a manitol (Figura 9 e Tabela 3). Dos 30 genes testados, seis deles responderam a manitol no mesmo sentido que responderam a sacarose, indicando que sua resposta diferencial devia-se a sinal osmótico e não diretamente à sacarose. Dessa forma, efetivamente, encontramos 24 genes responsivos à sacarose, indicativo de possíveis elementos de sinalização rápida por este açúcar (Tabela 3). Dentre estes 24, apenas oito deles são induzidos por sacarose e 16 se mostram reprimidos por este açúcar (Tabela 3).

Depois de transportada aos tecidos, a sacarose pode ser clivada em glicose e frutose. A glicose, por representar um sinal importante no controle da homeostase energética, no desenvolvimento e crescimento de plantas e sua interação com sinalização por hormônios e agentes de estresses bióticos e abióticos, foi também

testada para sua capacidade de regular a expressão dos 24 genes cuja expressão foi modulada pela sacarose. Dos 24 genes testados, 19 se mostraram diferencialmente expressos em presença de glicose, no mesmo sentido de resposta apresentado por tratamento com sacarose, indicando uma sobreposição entre esses dois sinais (Tabela 3). Tal fato já era esperado, pois, como dito anteriormente, a sacarose é convertida rapidamente em frutose e glicose e esses monossacarídeos podem funcionar como sinal. Identificamos dessa forma, cinco genes não responsivos à glicose e que, aparentemente, respondem especificamente ao sinal de sacarose. A tabela 3 mostra 34 genes (SAS) testados, categorias e subcategorias funcionais em que estão incluídos, juntamente com seus sentidos de resposta para tratamentos com sacarose, glicose e manitol. A figura 10 mostra a expressão destes 24 genes em resposta aos tratamentos com os açúcares qRT-PCR. glicose sacarose partir das reações de e а

	• 、	1 1	
Labela 3 NAN	responsivos a sacarose	glicose e manifol em	niantillas de cana-de-acilcar
1 abcia 5. 5715	responsivos a sacarose,	Shoose e maintor em	pluittulus de culta de açacar.

Genes (SAS)	Categoria	Subctegoria 1	Subcategoria 2	Sacarose-can a	Glicose-cana	Manitol
SCCCAM1001A03.g	calcium metabolism	calmodulin-binding protein	Multidrug resistant (MDR) ABC transporter			
SCRFLR2037F09.g	calcium metabolism	calreticulin	CRT2 Calreticulin 2			
SCJFRT1005C11.g	biosynthesis		oxido-redutase			
SCEQRT1024E12.g	phenylpropanoid synthesis	cell wall and defense	Phenylalanine ammonia- lyase			
SCBGLR1023D05.g	pathogenicity	R-gene transduction	Zinc finger protein (LSD1)			
SCJFRZ2032G01.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneSnRK1-2			
SCCCRT2001H11.g	small GTPase	ARF (ADP-ribosylation factor)	ARF1			
SCCCLR2C01F06.g	stress	wound-induced	wound-responsive family protein			
SCJLHR1028C12.g	DNA metabolism	histone	Histone H4			
SCCCRZ1001G10.g	transcription factor	hormone-related/Aux/IAA	Auxin-responsive protein IAA16			
SCCCRT1001E01.g	hormone biosynthesis	jasmonic acid	Lipoxygenase			
SCBFSB1046D04.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneCIPK-16			
SCMCRT2103B04.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneCIPK-21			
SCCCLR1C05B07.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneCIPK-3			
SCEPRZ1009C10.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneOSA PK-1			
SCACLR2007G02.g	protein kinase	SNF-like kinase	canePKABA1-1			
SCRFLR1034G06.g	protein kinase	SNF-like kinase	canePKABA1-3			
SCEPRZ1010E06.g	protein phosphatase	serine/threonine PPM family	PP2C-like			
SCEZHR1088E02.g	protein phosphatase	tyrosine phosphatase	Dual Specificity Protein Phosphatases (DSPP)			

Continuação tabela 3.

Genes (SAS)	Categoria	Subctegoria 1	Subcategoria 2	Sacarose-cana	Glicose-cana	Manitol
SCQGLR1085F11.g	stress	drought-induced	Dehydrin			
SCCCLR1024E11.g	stress	superoxide dismutase	Cu/Zn (SOD2)			
(i			bHLH transcription	*		
SCCCRZ1001H05.g	transcription factor	HLH (helix-loop-helix)	factor			
SCAGLR1021G10.g	transcription factor	homeobox	KNOTTED1 homeodomain protein			
SCCCLR2003E10.g	transcription factor	NAM (no apical meristem)	NAC transcription factor / GRAB2 protein			
SCAGLR1043E04.g	Stress	Cytochrome P450	CYP74A			
SCEQRT1026H08.g	Stress	Cytochrome P450	CYP75			
SCBFLR1039B05.g	Carbohydrate Metabolism	Xyloglucan endotransglycosylase				
SCCCRZ1002E08.g	Stress	Drought and cold response	putative aquaporin		5	
SCCCRZ1001D02.g	Adapters	14-3-3 proteins				
SCEQRT2100B02.g	Stress	Drought and cold response	putative aquaporin		1	
SCSBHR1050B11.g	Development	Putative senescence-associated protein				
SCEQRT1028H06.g	Hormone biosynthesis	Auxin	Nitrilase			
SCRFLR1012F12.g	Others	caffeic acid 3-O- methyltransferase				
SCCCCL3120C09.g	Receptors	Receptor Ser/Thr kinase	cane RLK with LysM-1			
		donw	up)	manitol		

Na primeira coluna temos a identificação dos genes relacionados a acúmulo de sacarose, seguido da categoria e subcategorias nas quais estes genes estão incluídos. A três últimas colunas mostram a regulação destes genes pelos açúcares sacarose, glicose e manitol. O preenchimento em vermelho indica indução e o preenchimento em verde indica repressão. O preenchimento em amarelo indica os genes respondendo a sinal osmótico (manitol). Os demais genes que respondem a manitol apresentam regulação divergente quando comparada com a resposta por sacarose/glicose, indicando que a resposta do manitol para estes genes não é devido a efeito osmótico.



Figura 9. Regulação da expressão de genes relacionados a acumulo de sacarose no colmo de cana de açúcar em resposta a manitol As análises foram realizadas por RT -PCR quantitativo (qRT-PCR). Uma regulação por manitol é considerada como refletindo uma resposta osmótica. No eixo das abscissas temos 30 genes responsivos à sacarose. M- indica plântulas de cana-de-açúcar utilizadas como controle (sem tratamento com manitol) e M+ indica plântulas submetidas a tratamento com manitol 3% por 4 h. No eixo das ordenadas temos o valor da expressão média referente a 30 experimentos (indução/repressão) dos genes em relação ao gene de referência (tubulina SCCCRZ1002H03.g). O cálculo das barras de erros foi realizado como descrito em Livak & Schmittgen (2001). O nível de transcritos para o gene de referência mostrou não variar significativamente em resposta aos tratamentos (Figura 8). Os seis últimos genes apresentam resposta osmótica (manitol) (Tabela 3).

4.3. Genes responsivos à sacarose

Com relação aos genes diferencialmente expressos a partir do tratamento de plântulas de cana-de-açúcar com sacarose, temos uma lista de 8 genes induzidos e 16 genes reprimidos. Descreveremos agora, com mais detalhes, quais são esses genes e a que categoria e/ou subcategorias funcionais em que eles estão incluídos. Para facilitar a análise, os genes induzidos e os genes reprimidos por sacarose são mostrados separadamente. Os gráficos de expressão dos genes regulados por sacarose podem ser visualizados na figura 10.

4.3.1. Genes induzidos por sacarose

Dentre os genes induzidos encontramos: um ABC transporter (SCCCAM1001A03.g) e uma calreticulina2 (SCRFLR2037F09.g), ambos relacionados ao metabolismo de cálcio; um gene codificante para uma óxido-redutase (SCJFRT1005C11.g), envolvida na biossíntese de flavonóides; uma fenilalanina amônia-liase ou PAL (SCEQRT1024E12.g), relacionada à síntese de parede celular e defesa: LSD1 (SCBGLR1023D05.g), envolvida em mecanismos uma de patogenicidade; uma SNF quinase caneSnRK1-2 (SCJFRZ2032G01.g); uma pequena GTPase ARF1 (SCCCRT2001H11.g) e um gene pertencente a uma família relacionada a estresse por injúria (SCCCLR2C01F06.g) (Figura 10 e tabela 3).

4.3.2. Genes reprimidos por sacarose

Temos, ao total, 16 genes reprimidos pelo tratamento de 4 horas com sacarose. Foram identificadas 6 SNF quinases: caneCIPK-16 (SCBFSB1046D04.g), caneCIPK-21 (SCMCRT2103B04.g), caneCIPK-3 (SCCCLR1C05B07.g), caneOSA PK-1 (SCEPRZ1009C10.g), canePKABA1-1 (SCACLR2007G02.g) e canePKABA1-3

(SCRFLR1034G06.g). Também encontramos quatro fatores de transcrição: um deles responsivo à Auxina, o IAA16 (SCCCRZ1001G10.g); outro fator pertencente à família dos HLH (helix-loop-helix) (SCCCRZ1001H05.g); um fator de transcrição da família KNOTTED1 (SCAGLR1021G10.g) família e outro pertencente à NAC (SCCCLR2003E10.g). Além disso, também temos dois genes relacionados a estresse: uma deidrina (SCQGLR1085F11.g) e uma superóxido desmutase, a SOD2 (SCCCLR1024E11.g). Encontramos ainda uma histona (SCJLHR1028C12.g), uma lipoxigenase (SCCCRT1001E01.g) e duas proteínas fosfatases: uma PP2C (SCEPRZ1010E06.g) e uma DSPP (SCEZHR1088E02.g) (Figura 10 e tabela 3).

4.4. Genes responsivos à glicose

Os mesmos 24 genes foram analisados através de reações de qRT-PCR, para três experimentos distintos, porém agora, a partir do tratamento de plântulas de cana-deaçúcar com glicose. Dezenove genes se mostraram regulados por glicose e destes, 5 genes foram induzidos e 14 se mostraram reprimidos. Da mesma forma que procedido para sacarose, descreveremos agora, com mais detalhes, quais são esses genes e a que categoria e/ou subcategorias funcionais em que eles estão incluídos. Para facilitar a análise, os genes induzidos e os genes reprimidos por glicose são mostrados separadamente. Os gráficos de expressão para os genes regulados por glicose podem ser visualizados na figura 10.

4.4.1. Genes induzidos por glicose

Dentre os genes induzidos por glicose, temos: uma calreticulina 2 (SCRFLR2037F09.g); óxido-redutase (SCJFRT1005C11.g); uma PAL uma (fenilalanina amônia-liase) (SCEQRT1024E12.g); a pequena GTPase ARF1 (SCCCRT2001H11.g) e um gene relacionado injúria а estresse por (SCCCLR2C01F06.g) (Figura 10 e tabela 3).

4.4.2. Genes reprimidos por glicose

Com relação aos genes reprimidos por glicose temos, quatro SNF quinases: caneCIPK-3 (SCCCLR1C05B07.g), caneOSA PK-1 (SCEPRZ1009C10.g), canePKABA1-1 (SCACLR2007G02.g) e canePKABA1-3 (SCRFLR1034G06.g). Também encontramos quatro fatores de transcrição: um responsivo à Auxina, o IAA16 (SCCCRZ1001G10.g), um pertencente à família HLH (helix-loop-helix) (SCCCRZ1001H05.g), outro pertencente à família KNOTTED1 (SCAGLR1021G10.g)

e um último pertencente à família NAC (SCCCLR2003E10.g). Temos também, como genes reprimidos em presença de glicose, uma deidrina seca-relacionada (SCQGLR1085F11.g) e uma superoxido desmutase, a SOD2 (SCCCLR1024E11.g). Encontramos ainda uma histona (SCJLHR1028C12.g), uma lipoxigenase (SCCCRT1001E01.g) e duas fosfatases: uma PP2C (SCEPRZ1010E06.g) e uma DSPP (SCEZHR1088E02.g) (Figura 10 e tabela 3).
4.5. Genes regulados especificamente por sacarose

Como descrito anteriormente, dos 24 genes responsivos à sacarose, 19 deles também respondem à glicose. Não foram considerados genes responsivos à glicose aqueles genes cuja expressão não foi alterada estatisticamente em relação ao controle ou que não apresentavam o mesmo padrão de resposta ao mostrado pelos genes responsivos à sacarose. Esta informação indica a existência de uma sinalização restrita ao sinal sacarose a partir de cinco genes considerados sacarose-específicos. Dentre estes temos, três SNF quinases: caneSnRK1-2 (SCJFRZ2032G01.g), caneCIPK-16 (SCBFSB1046D04.g) e caneCIPK-21 (SCMCRT2103B04.g); a LSD1, relacionada a mecanismos de patogenicidade (SCBGLR1023D05.g) e um ABC transporter, relacionado ao metabolismo de cálcio (SCCCAM1001A03.g). Isso é indicativo de que glicose e sacarose podem parcialmente sinalizar de maneira independente (são vias específicas para cada sinal destes dois carboidratos) (Figura 10 e tabela 3).





Figura 10. Análise quantitativa da expressão de 24 genes candidatos em resposta à glicose e/ou sacarose. Os RNA dos 24 genes foram quantificados por qRT-PCR O eixo das ordenadas refere-se à razão da expressão relativa entre o mRNA do gene analisado versus o mRNA do gene de referência (tubulina SCCCRZ1002H03.g). O RNA foi extraído de plântulas com idade de 13 dias tratadas com 3% de sacarose e 3% de glicose por 4 horas. R1, R2 e R3 referem-se às repetições de três diferentes experimentos controles e três diferentes experimentos tratados com sacarose e glicose. Os experimentos controles são distintos para os tratamentos com sacarose e glicose. As barras de erros foram calculadas como descrito em M&M. O nível de transcritos para o gene de referência mostrou não variar significativamente em resposta aos tratamentos. O valor P corresponde à probabilidade Pr (Tratrado>Controle) e Pr (Tratado<Controle), para genes induzidos e reprimidos, respectivamente. Os genes foram considerados diferencialmente quando 0.95 marcados expressos Р \geq e estão com asterisco.

4.6. Acúmulo de sacarose e resposta a açúcar

Os resultados obtidos nos mostram que muitos dos genes diferencialmente expressos para genótipos contrastantes na sua capacidade de acúmulo de sacarose também apresentam resposta rápida para tratamentos com açúcar. Como a maioria desses genes está relacionada a funções de transdução de sinal (proteínas quinases e fosfatases, fatores de transcrição e genes relacionados à biossíntese de hormônios), eles aparentemente, poderiam constituir componentes iniciais da cascata regulatória. Estes dados sugerem uma possível ligação de elementos sinalizadores de açúcar e acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar. A tabela 4 mostra o padrão de resposta (indução ou repressão) dos genes responsivos a glicose e/ou sacarose, alto versus baixo Brix e entrenó maduro versus entrenó imaturo, juntamente com as categorias e subcategorias funcionais em que estão incluídos. **Tabela 4.** Regulação dos 24 genes em tratamentos de sacarose/glicose e genótipos contrastantes para acúmulo de sacarose em genótipos de cana-de-açúcar com alto Brix e em entrenó maduros.

Genes (SAS)	Categoria	Subcategoria 1	Subcategoria 2	Sacarose-cana	Glicose-cana	MIn vs IIn	HB vs LB
SCCCAM1001A03.g	calcium metabolism	calmodulin-binding protein	Multidrug resistant (MDR) ABC transporter				
SCRFLR2037F09.g	calcium metabolism	calreticulin	CRT2 Calreticulin 2				
SCJFRT1005C11.g	biosynthesis		oxido-redutase				
SCEQRT1024E12.g	phenylpropanoi d synthesis	cell wall and defense	Phenylalanine ammonia-lyase				
SCBGLR1023D05.g	pathogenicity	R-gene transduction	Zinc finger protein (LSD1)				
SCJFRZ2032G01.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneSnRK1-2				
SCCCRT2001H11.g	small GTPase	ARF (ADP- ribosylation factor)	ARF1				
SCCCLR2C01F06.g	stress	wound-induced	wound-responsive family protein				
SCJLHR1028C12.g	DNA metabolism	histone	Histone H4				
SCCCRZ1001G10.g	transcription factor	hormone- related/Aux/IAA	Auxin-responsive protein IAA16				
	hormone	,	.				
SCCCR11001E01.g	biosynthesis	jasmonic acid	Lipoxygenase				
SCBFSB1046D04.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneCIPK-16				
SCMCRT2103B04.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneCIPK-21				
SCCCLR1C05B07.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneCIPK-3				
SCEPRZ1009C10.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneOSA PK-1				
SCACLR2007G02.g	protein kinase	SNF-like kinase	canePKABA1-1				
SCRFLR1034G06.g	protein kinase	SNF-like kinase	canePKABA1-3				
SCEPRZ1010E06.g	protein phosphatase	serine/threonine PPM family	PP2C-like				
SCEZHR1088E02.g	protein phosphatase	tyrosine phosphatase	Dual Specificity Protein Phosphatases (DSPP)				
SCQGLR1085F11.g	stress	drought-induced	Dehydrin				
SCCCLR1024E11.g	stress	superoxide dismutase	Cu/Zn (SOD2)				
SCCCRZ1001H05 g	transcription factor	HLH (helix-loop- helix)	bHLH transcription factor				
SCAGLR1021G10.g	transcription factor	homeobox	KNOTTED1 homeodomain protein				
SCCCLR2003E10.g	transcription factor	NAM (no apical meristem)	NAC transcription factor / GRAB2 protein				

Na primeira coluna temos a identificação dos genes relacionados a acúmulo de sacarose, seguido da categoria e subcategorias nas quais estes genes estão incluídos. As quatro últimas colunas mostram a regulação destes genes pelos açúcares sacarose, glicose e genótipos contrastantes para acúmulo de sacarose alto Brix e entrenó maduro. O preenchimento em vermelho indica indução e o preenchimento em verde indica repressão. HB-alto Brix; LB-baixo Brix; Mln-entrenó maduro.

Faremos, agora, uma comparação entre o sentido de resposta destes genes. Primeiramente relacionando os tratamentos por sacarose e por glicose e genótipos contrastantes para acúmulo de sacarose (HB X LB) e, posteriormente relacionando os genes regulados por estes açúcares à resposta destes em entrenós maduros X imaturos. Assim, compararemos o sentido de resposta dos 24 genes para estas três características: regulação rápida por açúcar, Brix e entrenó. Para facilitar a análise, os genes estão divididos em duas categorias: aqueles regulados num mesmo sentido para tratamentos com glicose e/ou sacarose e Brix/entrenó maduro e aqueles que apresentam sentido de resposta oposto.

4.6.1. Mesmo sentido de resposta

Encontramos 17 genes em comum entre resposta por glicose e/ou sacarose e genótipos contrastantes para acúmulo de sacarose (HB x LB), sendo que 9 deles respondem no mesmo sentido (induzidos ou reprimidos em ambas as características) (Tabela 4). Dentre os genes induzidos por glicose e/ou sacarose e também em plantas de genótipo alto Brix temos um ABC transporter (SCCCAM1001A03.g), uma óxido-(SCJFRT1005C11.g), redutase uma fenilalanina amônia liase/ PAL (SCEQRT1024E12.g), uma LSD1 (SCBGLR1023D05.g) e um gene relacionado a estresse por injúria (SCCCLR2C01F06.g). Já os genes reprimidos por glicose e/ou sacarose e em plantas de genótipo alto Brix, encontramos uma lipoxigenase (SCCCRT1001E01.g); uma fosfatase PP2C (SCEPRZ1010E06.g); uma deidrina (SCQGLR1085F11.g) e um fator de transcrição pertencente à família NAC (SCCCLR2003E10.g).

Com relação à capacidade de acúmulo de sacarose em entrenós maduros versus imaturos e resposta à glicose e/ou sacarose temos também 17 genes em comum, sendo

que 10 deles são responsivos num mesmo sentido (induzidos ou reprimidos em ambas as características) (Tabela 4). Apenas um gene relacionado a estresse por injúria (SCCCLR2C01F06.g) é induzido por açúcar e em entrenós maduros. Já os genes reprimidos tanto por glicose e/ou sacarose quanto em entrenós maduros constituem um grupo de 9 genes: uma histona H4 (SCJLHR1028C12.g); um fator de transcrição responsivo à auxina. IAA16 (SCCCRZ1001G10.g); uma lipoxigenase (SCCCRT1001E01.g); uma SNF quinase caneOSA PK-1 (SCEPRZ1009C10.g); uma proteína fosfatase PP2C-like (SCEPRZ1010E06.g); uma tirosina fosfatase DPPC (SCEZHR1088E02.g); uma deidrina (SCQGLR1085F11.g); uma superóxido desmutase SOD2 (SCCCLR1024E11.g) e um fator de transcrição da família KNOTTED1 (SCAGLR1021G10.g).

De maneira significativa, apenas quatro genes apresentam mesmo sentido de resposta para as três condições, um gene de resposta a estresse por injúria (SCCCLR2C01F06.g), induzido por glicose e sacarose, em plantas alto Brix e em entrenós maduros; uma lipoxigenase (SCCCRT1001E01.g), uma fosfatase PP2C (SCEPRZ1010E06.g) e uma deidrina (SCQGLR1085F11.g), reprimidos nas três condições (Tabela 4).

Genes responsivos a tratamento curto (4 horas) por sacarose e glicose podem representar intermediários iniciais da cascata de regulação ativada por este açúcares. A observação de que alguns destes genes também apresentam uma regulação diferencial entre alto Brix e/ou em entrenós maduros que seja compatível (mesmo sentido) com as regulações rápidas, podem parcialmente refletir a existência de um maior fluxo de açúcar e/ou uma maior sensibilidade a açúcar apresentada por plantas que apresentam genótipos com alto Brix.

4.6.2. Sentido oposto de resposta

Sentidos opostos de resposta para alto Brix e resposta rápida a acúcar foram encontrados em 8 genes (Tabela 4). A calreticulina (SCRFLR2037F09.g) é induzida por reprimida em alto Brix. Já as SNFs quinases caneCIPK-16 acúcar e (SCBFSB1046D04.g), caneCIPK-21 (SCMCRT2103B04.g), caneCIPK-3 (SCCCLR1C05B07.g), canePKABA1-1 (SCACLR2007G02.g) e canePKABA1-3 (SCRFLR1034G06.g) e ainda a tirosina fosfatase DSPP (SCEZHR1088E02.g) e o fator de transcrição da família HLH (SCCCRZ1001H05.g) são reprimidos por glicose e/ou sacarose e induzidos em alto Brix.

Respostas opostas em relação a tratamento por açúcar e acúmulo de sacarose em entrenó maduro aparecem em 7 genes (Tabela 4). A calreticulina (SCRFLR2037F09.g), a óxido-redutase (SCJFRT1005C11.g), a PAL (SCEQRT1024E12.g), a LSD1 (SCBGLR1023D05.g), a SNF quinase caneSnRK1-2 (SCJFRZ2032G01.g) e a ARF1 (SCCCRT2001H11.g) são genes induzidos por açúcar e reprimidos em entrenós maduros. Apenas caneCIPK-21 (SCMCRT2103B04.g) é reprimido por açúcar e induzido em entrenó maduro.

Padrões regulatórios opostos são mais difíceis de serem explicados, podendo refletir, por exemplo, diferenças referentes a fases de desenvolvimento e/ou tecidos das plantas utilizadas em cada tipo de experimento. Nos experimentos com adição de açúcar foram utilizadas plântulas de cana-de-açúcar de 13 dias de idade, já para os experimentos de acúmulo de sacarose, foram utilizadas plantas adultas. Outro aspecto a ser considerado é a forma de condução de cada experimento. Para os experimentos de sinalização por açúcar, as plântulas foram mantidas em um ambiente padronizado, sob luz e temperatura constantes. Já as plantas utilizadas para os experimentos de acúmulo

de sacarose foram mantidas em campo, sob influência de agentes externos como flutuação de temperatura, luz etc.

4.7. Avaliação preliminar da conservação evolutiva das redes de sinalização por açúcares

As angiospermas surgiram há, aproximadamente, 200 milhões de anos e atualmente estão representadas por um número próximo de 250 mil espécies. Espécies separadas pela evolução há, aproximadamente, 150-200 milhões de anos, *Arabidopsis thaliana* e *Sacharum* spp fazem parte de duas classes distintas de angiospermas, as eudicotiledôneas e as monocotiledôneas, respectivamente. Em vista de todo o contexto já apresentado com relação à importância do papel de carboidratos como sinalizadores, comparar a regulação por glicose e sacarose de genes de cana e seus genes ortólogos e/ou evolutivamente relacionados em Arabidopsis pode nos dar informações importantes a respeito de como as vias de sinalização por açúcar evoluíram entre mono e eudicotiledôneas.

Para então compararmos a regulação por açúcar entre genes de cana e seus ortólogos e/ou genes evolutivamente relacionados em Arabidopsis, foi feita uma busca utilizando-se o programa tblastx (Altcchul et al., 1997) para os 24 SAS de interesse como query contra um banco de proteínas contendo o proteoma predito de todos os genomas completamente sequenciados de plantas verdes. As quarenta primeiras seqüências apresentando a maior similaridade com cada SAS foram selecionadas para procedermos a uma análise filogenética através do método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), com distâncias calculas por *p-distance* (Nei & Kumar, 2000). Este processo possibilitou a identificação das prováveis seqüências ortólogas em Arabidopsis do SAS de cana-de-açúcar analisado. Os genes ortólogos de Arabidopsis assim como os genes homólogos de Arabidopsis mais próximos (em um clado irmão, por exemplo) dos SAS

que foram usados como *query*, foram comparados com o conjunto de genes de Arabidopsis regulados por glicose e/ou sacarose a partir de dados disponíveis na literatura (ver M&M).

Genes aparentados entre esses representantes de mono e eudicotiedôneas que apresentam mesmo sentido de resposta podem indicar conservação de certos aspectos da sinalização por acúcar entre cana e Arabidopsis, tornando-se excelentes candidatos para estudos funcionais mais aprofundados, já que também estão relacionados a acúmulo de sacarose em cana. Por outro lado, genes aparentados entre cana-de-açúcar e Arabidopsis que apresentam padrões de regulação oposta podem ser indicativos do grau de divergência que essas espécies atingiram na sinalização por glicose e sacarose. De maneira complementar, pode-se sugerir que a regulação da expressão é mais facilmente alterável sem prejudicar a funcionalidade do gene e, portanto evolui mais rapidamente do que as seqüências codificantes. Devemos ainda levar em consideração para genes de resposta oposta, que dentro de famílias multigências em cana-de-açúcar, um gene que estamos analisando apresenta sentido oposto de resposta em relação ao seu ortólogo em Arabidopsis, contudo, outro gene de cana da mesma família, mas ainda não identificado, pode apresentar mesmo padrão de resposta que o encontrado em Arabidopsis, indicando uma deficiência da amostragem dos genes de cana (devido ao fato de não termos este genoma completamente sequenciado). A ocorrência de genes de respostas opostas ainda nos dá um indicativo da complexidade evolutiva apresentada por famílias multigênicas. Como a evolução de genes pertencentes a famílias multigênicas ocorre é algo ainda pouco compreendido e pouco estudado. Outro ponto a ser considerado é que genes com regulação oposta podem indicar traços adaptativos de cada linhagem ao longo da evolução das angiospermas que proporcionaram vantagens seletivas para estas plantas.

Faremos agora uma descrição mais detalhada a respeito do número de genes ortólogos e/ou genes homólogos relacionados (em clados irmãos, por exemplo, como descrito anteriormente) dos 24 SAS relacionados a acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar e sinalização rápida por carboidratos.

Encontramos 16 SAS de cana-de-açúcar que apresentam genes ortólogos em *Arabidopsis thaliana*, 4 SAS que, aparentemente, são monocotiledônea-específicos, 3 SAS que apresentam genes homólogos relacionados em Arabidopsis e mais 1 SAS que, aparentemente *A. thaliana* perdeu o(s) gene(s) do grupo de ortólogos onde está. A tabela 5 mostra as relações de ortologia e regulações pelos açúcares sacarose e glicose entre os 24 SAS de cana-de-açúcar e os genes de *Arabidopsis thaliana*.

Tabela 5. Relações de ortologia e regulações pelos açúcares sacarose e glicose entre os 24 SAS de cana-de-açúcar e os genes de Arabidopsis.

SAS (Genes)	Categoria	Subctegoria 1	Subcategoria 2	Sacarose-cana	Glicose-cana	Sacarose Arabidopsis thallana	Glicuse Arabidopsis thaliana	
SCCCAM1001A03.g	calcium metabolism	calmodulin- binding protein	Multidrug resistant (MDR) ABC transporter			elados imãos / proximo regulado. AT2G36910		
SCRFLR2037F09.g	calcium metabolism	calreticulin	CRT2 Calreticulin 2			Ortólogos AT1G56	340 e AT1 G09216	
SCJFRT1005C11.g	biosynthesis		oxido-redutase			monocot específico/ próximo regulado AT3G21420		
SCEQRT1024E12.g	phenylpropanoid synthesis	cell wall and defense	Phenylalanine ammonia-lyase			ortólógos AT2037040 e AT3053260	ortólogo ATSG10340	
SCBGLR1023D05.g	pathogenicity	R-gene transduction	Zinc finger protein (LSD1)			ortólogo único) AT1G32540	
SCJFRZ2032G01.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneSnRK1-2				ortólogo AT3G01090	
SCCCRT2001H11.g	small GTPase	ARF (ADP- ribosylation factor)	ARF1			próximos regulados: AT 1G10630 e AT 1 G70490		
SCCCLR2C01F06.g	stress	wound-induced	wound-responsive family protein				próximo regulado AT4G10270	
SCJLHR 1028C12.g	DNA metabolism	histone	Histone H4			ortólogo nã	o regulado	
SCCCRZ1001G10.g	transcription factor	hormone- related/Aux/IAA	Auxin-responsive protein IAA 16		45-04	ortólogo A.	F3G04730	
SCCCRT1001E01.g	hormone biosynthesis	jasmonic acid	Lipoxygenase			ortólogo AT 1955020		
SCBFSB1046D04.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneCIPK-16			ortólogos não regulados		

SAS (Genes)	Categoria	Subctegoria 1	Subcategoria 2	Sacarose-cana	Glicose-cana	Sacarose Arabidopsis thaliana	Glicose Arabidopsis thaliana	
SCMCRT2103B04.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneCIPK-21			ortólogo AT3G23000 é induzido		
SCCCLR1C05B07.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneCIPK-3			monocot específico/ próximo regulado: AT1G01140	monocot específico	
SCEPRZ1009C10.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneOSA PK-1			monocot específico		
SCACLR2007G02.g	protein kinase	SNF-like kinase	canePKABA1-1					
SCRFLR1034G06.g	protein kinase	SNF-like kinase	canePKABA1-3			Ortólogo A	T1G78290	
SCEPRZ1010E06.g	protein phosphatase	serine/threonine PPM family	PP2C-like			ortólogos não regulados		
SCEZHR 1088E02.g	protein phosphatase	tyrosine phosphatase	Dual Specificity Protein Phosphatases (DSPP)			relacionados r	ião regulados	
SCQGLR1085F11.g	stress	drought-induced	Dehydrin			ortólogo A	T3G50980	
SCCCLR1024E11.g	stress	superoxide dismutase	Cu/Zn (SOD2)			ortólogo nã	io regulado	
SCCCRZ1001H05.g	transcription factor	HLH (helix-loop helix)	bHLH transcription factor			monocot específico	monocot específico/ proximos: AT3G23210 e AT4G14410	
SCAGLR1021G10.g	transcription factor	homeobox	KNOTTED1 homeodomain protein			ortólogo nâ	io regulado	
SCCCLR2003E10.g	transcription factor	NAM (no apical meristem)	NAC transcription factor / GRAB2 protein				próximo regulado: AT3G15500	
		donw	up.					

Na primeira coluna temos a identificação dos genes relacionados a acúmulo de sacarose, seguido da categoria e subcategorias nas quais estes genes estão incluídos. As quatro últimas colunas mostram a regulação destes genes pelos açúcares sacarose, glicose em cana-de-açúcar e nos genes ortólogos ou relacionados de *Arabidopsis thaliana*. Os SAS correspondem aos prováveis transcritos de cana-de-açúcar (*Sugarcane Assembled Sequences*). Os genes de Arabidopsis são identificados pelo nome AGI e categorizados funcionalmente pela anotação do banco de dados TAIR (www.arabidopsis.org). O preenchimento em vermelho indica indução e o preenchimento em verde indica repressão.

4.7.1. SAS que apresentam genes ortólogos em Arabidopsis

Grupos de ortólogos são definidos como sendo o resultado da divergência de um gene ancestral após um evento de especiação. Para melhor entendimento, a figura 11 (material anexo) mostra claramente um caso de grupo de ortólogos de monocots e eudicots. Para 16 SAS, foram detectados ortólogos em Arabidopsis: um gene ABC transporter (SCCCAM1001A03.g), um gene CRT2 (SCRFLR2037F09.g); uma fenilalanina amônia-liase (SCEQRT1024E12.g); (PAL) LSD1 uma (SCBGLR1023D05.g); uma histona H4 (SCJLHR1028C12.g); um fator de transcrição IAA16 (SCCCRZ1001G10.g); uma lipoxigenase (SCCCRT1001E01.g); cinco SNF quinases (SCJFRZ2032G01.g, SCBFSB1046D04.g, SCMCRT2103B04.g, SCACLR2007G02.g e SCRFLR1034G06.g); uma fosfatase (SCEPRZ1010E06.g); uma deidrina (SCQGLR1085F11.g); uma superóxido desmutase (SCCCLR1024E11.g) e um fator de transcrição da família KNOTTED1 (SCAGLR1021G10.g).

Os resultados de comparação em termos de regulação por glicose e sacarose entre os SAS de cana-de-açúcar e genes ortólogos de Arabidopsis nos mostram que 10 SAS apresentam ortólogos em Arabidopsis thaliana também regulados por glicose e/ou sacarose (Tabela 5). Destes, 6 apresentam ortólogos com mesmo sentido de resposta (induzidos ou reprimidos ambas espécies). А calreticulina 2 em as (SCRFLR2037F09.g), induzida por glicose e por sacarose em cana-de-açúcar, apresenta dois genes ortólogos em Arabidopsis thaliana (ATIG56340 e ATIG09210) também induzidos por estes dois açúcares (Figura 11-anexo). O gene da PAL (SCEQRT1024E12.g), também induzido por sacarose e por glicose em cana, apresenta quatro genes ortólogos regulados em Arabidopsis: AT2G37040 e AT3G53260, induzidos por sacarose, AT3G10340, induzido por glicose e AT5G04230, reprimido por glicose (Figura 12-anexo). O fator de transcrição IAA16 (SCCCRZ1001G10.g),

reprimido por sacarose e glicose em cana, possui o gene ortólogo *AT3G04730* também reprimido por estes dois açúcares em Arabidopsis (Figura 13-anexo). Os dois SAS correspondentes a duas SNF quinases, canePKABA1-1 e canePKABA1-3 (SCACLR2007G02.g e SCRFLR1034G06.g), são genes parálogos reprimidos por glicose e sacarose em cana-de-açúcar e possuem um único gene ortólogo (*AT1G78290*), também reprimido por estes dois açúcares em *A. thaliana* (Figura 14-anexo). A deidrina (SCQGLR1085F11.g), reprimida por sacarose e glicose em cana, apresenta os genes ortólogos *AT3G50980*, reprimido por estes dois açúcares e AT5G66400 reprimido por sacarose em Arabidopsis (Figura 15-anexo).

Quatro SAS de cana de açúcar apresentam genes ortólogos em Arabidopsis com sentido oposto de resposta a glicose e/ou sacarose: uma LSD1 (SCBGLR1023D05.g), induzida por sacarose em cana-de-açúcar, apresenta o gene ortólogo de Arabidopsis *AT1G32540* reprimido por sacarose e glicose (Figura 16-anexo). O gene da lipoxigenase (SCCCRT1001E01.g), reprimido por sacarose e glicose em cana, possui o ortólogo *AT1G55020* induzido por ambos os açúcares em *A. thaliana* (Figura 17-anexo). Já o gene da SNF quinase caneSnRK1-2 (SCJFRZ2032G01.g) é induzido por sacarose em cana e seu gene ortólogo de Arabidopsis *AT3G01090* é reprimido por glicose (Figura 18-anexo). Um último gene de regulação oposta é a SNF quinase caneCIPK-21 (SCMCRT2103B04.g), reprimida por sacarose em cana-de-açúcar e cujo gene ortólogo de Arabidopsis *AT3G23000* mostra-se induzido pelos sinais sacarose e glicose (Figura 19-anexo). Temos também o SAS SCCCAM1001A03.g, cujo ortólogo não é regulado por açúcar, contudo o gene homólogo de Arabidopsis *AT2G36910* é induzido por sacarose (Figura 20-anexo).

4.7.2. SAS monocotiledônea-específicos

Encontramos quatro SAS que, aparentemente estão incluídos em grupos de homólogos que são monocotiledônea-específicos, uma vez que não apresentam ortólogos em organismos eudicotiledônea. Uma óxido-redutase (SCJFRT1005C11.g); duas proteínas quinases : cane CIPK-3 e cane OSA-PK1 (SCCCLR1C05B07.g e SCEPRZ1009C10.g) e um fator de transcrição pertencente à família HLH (SCCCRZ1001H05.g). Destes, o gene da caneCIPK-3 (reprimido por sacarose e por glicose em cana) apresenta o gene homólogo próximo de Arabidopsis (AT1G01140) reprimido por sacarose (Figura 20-anexo). Este SAS (SCCCLR1C05B07.g) corresponde a um ótimo exemplo para visualizarmos um grupo monocot-específico, onde temos um grupo com apenas representantes de espécies monocotiledôneas (indicado por monocot, onde temos o SAS de cana) e um outro grupo, homólogo a este, com representantes de espécies de monocots e eudicots (indicado por monocot e eudicot). A óxido-redutase (induzida por sacarose e glicose em cana) apresenta um gene de Arabidopsis homólogo próximo, o AT3G21420, induzido por sacarose em Arabidopsis (Figura 22-anexo). Já o fator de transcrição HLH (reprimido por sacarose e por glicose em cana) apresenta dois genes homólogos próximos em Arabidopsis (AT3G23210 e AT4G14410), ambos induzidos por glicose, indicando regulação oposta. A SNF quinase cane OSA-PK1 não apresenta genes homólogos relacionados em Arabidopsis regulados por glicose e/ou sacarose (figura 23-anexo).

4.7.3. SAS que apresentam homólogos relacionados

Comparados com os casos em que as relações de ortologia entre genes de cana e Arabidopsis são claramente estabelecidas, temos três casos em que tais relações não estão bem claras, contudo podemos inferir uma relação de ortologia provável. Dependendo dos genes analisados, é inevitável a dificuldade no estabelecimento destas relações e isso se deve possivelmente à pequena distância genética entre as seqüências comparadas e ainda à limitação da amostragem (40 *best hits*). Esta ocorrência se aplica aos SAS: SCCCRT2001H11.g, uma pequena GTPase; SCCCLR2C01F06.g, um gene pertencente a uma família relacionada a estresse por injúria e SCCCLR2003E10.g, um fator de transcrição pertencente à família NAC. A GTPase (induzida por glicose e sacarose em cana) apresenta dois homólogos próximos de Arabidopsis (*AT1G10630* e *AT1G70490*) induzidos por sacarose (figura 24-anexo). O gene relacionado a estresse por injúria (induzido por sacarose e glicose em cana) apresenta um homólogo próximo de Arabidopsis (*AT4G10270*), induzido por glicose (figura 25-anexo). Já o fator de transcrição (reprimido por sacarose e por glicose em cana) apresenta um homólogo próximo em Arabidopsis (*AT3G15500*) reprimido por glicose (figura 26-anexo).

Ainda temos um caso relacionado ao SAS SCEZHR1088E02.g, uma fosfatase, em que, aparentemente, *A. thaliana* perdeu o(s) gene(s) do grupo de ortólogos onde está (Figura 27-anexo).

5. Discussão

5.1. Ortólogos com mesmo sentido de resposta

Num total de 24 SAS relacionados a acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar e também envolvidos em via de sinalização rápida pelos açúcares sacarose e/ou glicose apenas 6 deles apresentam genes ortólogos em Arabidopsis thaliana cuja regulação ocorre no mesmo sentido que em cana, correspondendo a 25% do total de genes inicialmente analisados. Essa avaliação preliminar das relações evolutivas de redes de sinalização por açúcares nos indica grande divergência em termos de regulação por glicose e/ou sacarose entre as angiospermas Saccharum spp e Arabidopsis thaliana, representantes de mono e eudicotiledôneas, respectivamente. Os SAS referentes à calreticulina 2 (SCRFLR2037F09.g), à fenilalanina amônia-liase (SCEQRT1024E12.g), ao fator de transcrição IAA16 (SCCCRZ1001G10.g), às proteínas SNF quinases (SCACLR2007G02.g/ SCRFLR1034G06.g) e à deidrina (SCQGLR1085F11.g) apresentam genes ortólogos em Arabidopsis thaliana, cujo sentido de resposta segue o apresentado pelo SAS em cana. O mesmo sentido de regulação apresentado por estes genes nos permite fazer inferências quanto à importância destes nos mecanismos de sinalização por carboidratos em Angiospermas, já que conservaram a regulação por glicose e/ou sacarose ao longo da evolução. Da mesma forma que os torna genes candidatos a estudos funcionais mais apurados, já que além da conservação da regulação por carboidratos também são genes relacionados a acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar.

Discutiremos agora com mais detalhes cada um dos genes ortólogos de *Arabidopsis thaliana* regulados por sacarose e/ou glicose destes 6 SAS de cana-deaçúcar e suas funções já documentadas na literatura.

A calreticulina 2, induzida por sacarose/glicose em cana, apresenta dois possíveis genes ortólogos em Arabidopsis thaliana (Figura 11), também induzidos por glicose e sacarose. Pesquisa feita no banco de dados de Arabidopsis thaliana TAIR (www.arabidopsis.org) deles. AT1G56340 mostra que um 0 (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=27292&type=locus) é uma calreticulina 1 (CRT1) segundo ortólogo, AT1G09210 e 0 (http://www.arabidopsis.org/servlets/ TairObject?id=136329&type=locus), uma calreticulina 2. 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 co-fator 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 sequestro desse íon, são proteínas-chave na participação de diferentes vias de sinalização. Já foi descrita a participação de íons Ca⁺² na sinalização por açúcar em plantas, como por exemplo, em tabaco (Iwata et al., 1998) e batata doce (Ohto e Nakamura, 1995). A calreticulina ocorre principalmente no retículo endoplasmático de plantas e mamíferos (Borisjuk et al., 1998; Opa set al., 1996), mas também já foi localizada no Complexo de Golgi de Liriodendron tulipifera (Navazio et al.,2002) e no envelope nuclear de milho e tabaco (Denecke et al., 1995). 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). Análises de expressão e estudos filogenéticos em *Arabidopsis thaliana* e arroz mostraram que, em plantas superiores, a CRT apresenta dois grupos diferentes: CRT1/CRT2 (parálogos), que apresentam grande similaridade em nível de seqüência quando comparadas à terceira isoforma, CRT3 (Nelson et al., 1997; Persson et al., 2003), sugerindo que na evolução da proteína houve dois eventos distintos de duplicação. Tanto monocotiledôneas quanto eudicotiledôneas apresentam esses dois grupos distintos de CRTs (Persson et al., 2003).

A fenilalanina amônia-liase (PAL) (SCEQRT1024E12.g), induzida por sacarose e glicose em cana-de-açúcar, apresenta quatro possíveis genes ortólogos em Arabidopsis thaliana (Figura 12). Dois deles são parálogos e regulados positivamente por sacarose А. thaliana. AT2G37040 em 0 (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=34243&type=locus) e 0 (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=40414&type=locus), AT3G53260 correspondentes a uma possível fenilalanina amônia-liase e a uma fenilalanina amônialiase 2. respectivamente. 0 terceiro possível ortólogo, AT3G10340 0 (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=35933&type=locus) é induzido por glicose em Arabidopsis thaliana e também corresponde a uma possível fenilalanina amônia-liase. A PAL catalisa a primeira reação da via de biossíntese de fenilpropanóides (Razal et al., 1996; van Heerden et al., 1996; Singh et al., 1998; Towers et al., 1998) e, assim, a formação de lignina, antioxidantes, antocianinas, fitoalexinas e flavonóides depende diretamente da atividade desta proteína fitoalexinas. A conversão da L-fenilalanina pela PAL acarreta a formação de ácido cinâmico, composto que pode ser convertido em ácido salicílico (Lee et al., 1995). O ácido salicílico está diretamente envolvido em respostas estresse-relacionadas pelas plantas,

principalmente a ataque por patógenos. Os genes da PAL constituem uma pequena família multigênica em plantas, presente em feijão, salsinha, arroz, batata, tomate e Arabidopsis thaliana. A batata, contudo, parece ser uma exceção, com mais de quarenta cópias registradas (Joos e Hahlbrock, 1992). Em contrapartida, A. thaliana parece ter apenas quatro isoformas. Dados do TAIR indicam que o padrão de expressão de PAL1 e PAL2 é bastante semelhante entre si nos mais diversos tecidos, como caule, raiz e flores e também que essas duas isoformas são mais expressas que PAL 4 e PAL3. Foi proposta a participação dos genes PAL1 e PAL2 de Arabidopsis thaliana em processos de lignificação (Ohl et al., 1990; Mauchi-Mani e Slusarenko, 1996; Rookes e Cahill, 2003, Costa et al., 2003). O aumento da demanda de açúcar na planta a partir de tratamentos com sacarose e glicose tem como conseqüência aumento da produção de cadeias carbônicas que podem ser utilizadas para estrutura e crescimento das plantas, a partir da biossíntese de parede celular, tendo em vista a participação da PAL no processo de lignificação. Sabemos ainda que os açúcares estão ligados diretamente em resposta a estresses bióticos e abióticos, o que pode ser uma possível explicação para a regulação positiva desse gene por açúcar, participando na via de produção de ácido salicílico. Um fato interessante é um outro possível ortólogo da PAL em A. thaliana, o AT5G04230 (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=130939&type=locus) (Figura 12), ser regulado negativamente por glicose. Analisando-se os dados do TAIR, notamos que esse gene também é membro da família multigênica da PAL e constitui a isoforma PAL3, que difere significativamente de PAL1, PAL2 e de outras seqüências de genes PAL de outras plantas, podendo ser uma possível explicação para a diferença na regulação de carboidrato apresentada por esse gene. A regulação oposta por acúcar apresentada por este ortólogo ainda nos levanta a questão de como ocorre a evolução da regulação de genes pertencentes a famílias multigênicas, algo ainda pouco conhecido.

Em cana, 0 fator de transcrição responsivo à auxina IAA16 (SCCCRZ1001G10.g), é regulado negativamente por sacarose e por glicose. Analisando-se a árvore filogenética (Figura 13), percebemos que o SAS apresenta 4 possíveis genes ortólogos em Arabidopsis thaliana, sendo que um deles, o AT3G04730 (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=37460&type=locus), também se mostra reprimido por esses dois acúcares. Sabemos que a auxina desempenha um papel crucial em diversos aspectos de crescimento e desenvolvimento das plantas (Salmon et al., 2007). A auxina regula o tropismo, a dominância apical, o desenvolvimento da raiz, bem como a arquitetura de plantas adultas (Woodward e Bartel, 2005). Estudos genéticos e moleculares da transdução de sinal da auxina revelaram que três grandes famílias de genes são induzidas em resposta à auxina. A família Aux/IAA é uma das mais estudadas e conta com 29 membros em Arabidopsis thaliana (Reed, 2001). Os genes IAA regulam negativamente a sinalização por auxina inibindo a atuação de reguladores positivos ARF que por sua vez regulam a expressão de genes modulados por auxina (Guilfoyle et al., 1998; Walker and Estelle, 1998; Dharmasiri et al., 2005; Kepinski e Leyser, 2005; Tan et al., 2007). A interação da glicose com a sinalização por auxina foi demonstrada pela insensibilidade maior do mutante da HXK1 de Arabidopsis thaliana (gin2; Moore et al., 2003) a um tratamento com auxina. Os mutantes gin2 de Arabidopsis thaliana mostraram deficiência na proliferação celular e formação de raiz, processos induzidos por auxina (Moore et al., 2003) (Figura 3, introdução). A repressão da expressão de um gene IAA pela glicose evidenciada aqui, revela um aspecto molecular da modulação da sensibilidade a auxina de acordo com a presença de glicose.

Dois SAS interessantes são SCACLR2007G02.g e SCRFLR1034G06.g, duas SNFs quinases responsivas à ABA, canePKABA1-1 e canePKABA1-3, respectivamente. Em cana-de-açúcar, ambos os genes são reprimidos tanto por sacarose quanto por glicose. Buscando seu parentesco em Arabidopsis thaliana, encontramos um único ortólogo ambos AT1G78290 para os genes, 0 (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=30205&type=locus), também regulado negativamente por glicose e sacarose nesta eudicotiledônea (Figura 14). Este ortólogo corresponde, nos bancos de dados de Arabidopsis thaliana, como uma possível proteína serina/treonina kinase. Além disso, consta nos bancos de dados que esta proteína apresenta semelhança a um gene homólogo próximo, o OPEN STOMATA 1 (AT4G33950, também visualizado na figura 14) (OST1)/SNRK2-6 em Arabidopsis thaliana, uma SNF quinase reguladora chave envolvida na via de transdução de sinal mediada por ABA nas células guarda (Mustilli et al.,2002). Sabe-se que o ácido abscísico (ABA) é o principal hormônio envolvido na resposta a seca em plantas e, em particular, no estômato através de sua atuação nas células-guarda e fechamento dos estômatos. O OST1 é colocado como o mais upstream dos reguladores positivos conhecidos na via de sinalização por ABA em células-guarda de Arabidopsis thaliana (Mustilli et al., 2002). Também é clara a relação existente entre ABA e açúcar. A utilização de mutantes afetados na biossíntese de ABA permitiu o estabelecimento de uma relação entre sinalização por ABA e resposta a açúcar (Rook e Bevan, 2003). Vários modelos para a interação desses compostos em vias de sinalização foram propostos. Arenas-Huertero e colaboradores (2000) propuseram um modelo em que a resposta à glicose é mediada por ABI4, gene envolvido na biossíntese de ABA, provocando o aumento da expressão deste hormônio. Rook e colaboradores (2001) favorecem o modelo em que ABA modula uma resposta tecidual, separada de açúcar. Neste exemplo mostramos a interação entre ABA, acúcar e proteínas quinases-chave na rede de sinalização por carboidratos, que mantiveram sua conservação em termos de regulação por glicose e sacarose ao longo da evolução das angiospermas.

Outro gene reprimido por glicose e sacarose em cana, cujo ortólogo também é reprimido em Arabidopsis thaliana é SCQGLR1085F11.g, uma deidrina, induzida por Um dos dois possíveis ortólogos, AT3G50980 seca. 0 (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=36736&type=locus) corresponde a uma deidrina xero1 (Figura 15). Este ortólogo é regulado negativamente por glicose e sacarose em Arabidopsis thaliana. Outro possível ortólogo, o AT5G66400 (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=132043&type=locus), reprimido por sacarose corresponde nos bancos de Arabidopsis thaliana a RAB 18 (Responsive to ABA 18), uma proteína também da família das deidrinas. 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. Tais propriedades bioquímicas apresentadas pelas deidrinas juntamente com a evidente correlação entre seu acúmulo e a desidratação de plantas, nos leva facilmente a uma de suas possíveis funções, a proteção. A visão clássica de sua atuação a incorpora como estabilizadora de membrana (Koag et al., 2003), mas ela também é capaz de se associar a proteínas e ácidos nucléicos. Sabemos também do envolvimento de ABA em respostas a estresse. Algumas enzimas envolvidas na biossíntese deste hormônio são induzidas por seca e por estresse osmótico (Nambara et al., 2005). O ácido abscísico ainda está ligado à expressão de uma série de genes, incluindo a indução de algumas deidrinas (Morris et al., 1991) e genes envolvidos na sinalização por açúcar (Gupta et al., 2005). A RAB 18, por exemplo, acumula-se em resposta a estresse por seca e em resposta à aplicação de ABA exógeno (Lang e Palva, 1992). Dentro do contexto apresentado, é evidente a ligação entre deidrinas, resposta a estresse, açúcar e ABA. Tendo como base o modelo de interação entre açúcares e hormônios mostrado na figura 3, uma possível inferência é que, neste caso, a glicose e/ou sacarose seriam os sinais envolvidos na repressão deste gene e que a via açúcar-repressão deidrina seria independente da via regulada pelo hormônio ABA, já que este induz a expressão de algumas deidrinas e é induzido por açúcar. Ou seja, as regulações desse gene por ABA e açúcar podem contar com a participação de vias distintas. Outro aspecto interessante com relação à deidirina é o fato desta proteína ser a única representante dos 24 SAS que apresenta o mesmo sentido de resposta (é reprimida) em todas as situações analisadas, ou seja, é reprimida por glicose e sacarose em cana, seus genes ortólogos de Arabidopsis thaliana também são reprimidos por glicose e sacarose e ainda é reprimida em alto Brix e entrenó maduro. Estes resultados nos mostram que além de ser um gene importante na participação de redes de sinalização por açúcar (conservação da regulação entre mono e eudicotiledôneas) ainda pode estar envolvida no maior fluxo/sensibilidade a açúcar apresentado por plantas alto Brix, indicando que este gene apresenta um papel fundamental nas plantas maior do que imaginamos.

5.2. Ortólogos com sentido oposto de resposta

Do total de 10 genes ortólogos encontrados em Arabidopsis thaliana a partir dos 24 SAS analisados, 4 deles são regulados por glicose e/ou sacarose de forma oposta à regulação apresentada em cana-de-açúcar. Os SAS correspondentes ao gene LSD1 (SCBGLR1023D05.g C), à SNF quinase caneSnRK1-2 (SCJFRZ2032G01.g), à lipoxigenase (SCCCRT1001E01.g) e à SNF quinase CIPK-21 (SCMCRT2103B04.g) apresentam genes ortólogos em Arabidopsis thaliana responsivos de forma oposta aos açúcares glicose e/ou sacarose em relação à sua regulação em cana. Padrões regulatórios opostos podem significar divergência em termos de regulação por glicose e/ou sacarose entre Saccharum sp e Arabidopsis thaliana, mostrando diversificação em redes de sinalização por açúcares ao longo da evolução de angiospermas. Podemos ainda inferir que a regulação da expressão é alterada de forma mais fácil, não prejudicando a funcionalidade do gene e, portanto evolui mais rapidamente do que a seqüência codificante. Da mesma forma aqui, cabe a discussão referente à regulação de genes pertencentes a famílias multigências. Dentro dessas famílias em cana-de-açúcar, um gene analisado apresenta sentido oposto de resposta em relação ao seu ortólogo em Arabidopsis thaliana, contudo, outro gene de cana da mesma família, mas ainda não identificado, pode apresentar mesmo padrão de resposta que o encontrado em Arabidopsis thaliana, indicando uma deficiência da amostragem dos genes de cana, já que todos os genes não estão identificados. Adicionalmente, genes de regulação oposta também podem ser indicativos da adaptação de linhagens mono/eudicotiledôneas que conferem uma vantagem seletiva, por exemplo, atuação desses genes em diferentes órgãos ou tecidos nessas linhagens.

Discutiremos agora com mais detalhes os genes ortólogos de Arabidopsis regulados de forma oposta por sacarose e/ou glicose de 2 SAS de cana-de-açúcar e suas

funções já documentadas na literatura. Tratam-se dos SAS relativos a uma LSD 1 (SCBGLR1023D05.g) e a uma lipoxigenase (SCCCRT1001E01.g). Estes SAS foram escolhidos, pois embora apresentem regulação por açúcar oposta quando comparada aos seus ortólogos de Arabidopsis, eles apresentam mesma regulação quando comparadas a genótipos de maior acúmulo de sacarose alto Brix, mostrando também que podem estar relacionados a um maior fluxo e/ou sensibilidade a acúcar apresentada por essas plantas.

O gene de cana que codifica para uma LSD1 corresponde ao SAS SCBGLR1023D05.g, induzido por sacarose e também induzidos em genótipos Brix. Em *A. thaliana*, seu gene ortólogo, o *AT1G32540* (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=137902&type=locus) (Figura 16), codifica uma proteína LSD1, tipo LOL1, reguladora positiva de morte celular (Epple et al., 2003). Dados obtidos a partir da supressão do gene LOL1 mostram uma diminuição da resistência de *Arabidopsis thaliana* a patógenos, enquanto que plantas trangências com superexpressão de LOL1 apresentam sua resistência aumentada a patógenos virulentos (Epple et al., 2003).

Já a lipoxigenase (SCCCRT1001E01.g), é reprimida por sacarose, glicose e em Brix em cana e seu gene ortólogo em Arabidopsis, 0 AT1G55020 (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=27350&type=locus), corresponde a LOX1 ou lipoxigenase 1 e é induzido pelos dois açúcares em Arabidopsis thaliana (Figura 17). As LOXs são dioxigenases, cujos primeiros produtos de suas reações de catálise são hidroperóxidos de ácidos graxos, produtos envolvidos em diversos tipos de regulação. Em plantas, esses ácidos são precursores de moléculas como ácido jasmônico, 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 (Gundlach et al., 1992), inibidores de proteases (Grimes et al., 1992) e ainda atuam como moléculas sinalizadoras em resposta ao estresse de plantas, particularmente, a injúrias provocadas por ataques de patógenos (Farmer e Ryan, 1990, 1992). As LOXs também parecem atuar na degradação da membrana celular durante a senescência (Siedow, 1991), bem como parecem ter participação no crescimento e desenvolvimento das plantas, já que foi observada uma correlação existente entre aumento da atividade desta enzima e tecidos de rápido crescimento, bem como em órgãos em elongação (Siedow, 1991). O gene de *Arabidopsis* LOX1 mostrou ser induzido em resposta ao ataque de patógenos.

5.3. Resposta sacarose-específica

A sacarose é a principal forma de translocação de açúcares em plantas e apenas mais recentemente surgiram evidências do papel da sacarose como sinalizador molecular. Pelo fato deste açúcar ser rapidamente convertido em glicose e frutose, torna-se difícil estabelecer uma função direta para esta molécula, já que os monossacarídeos resultantes podem atuar como sinal. Recentemente, um fator de transcrição do tipo bZIP de Arabidopsis, o *ATB2*, mostrou sofrer regulação pós transcricional por sacarose (Wiese, et al., 2004). Outros açúcares e até mesmo a combinação de glicose e frutose não reprimiram a tradução deste gene. O 5'UTR do mRNA do *ATB2* apresenta regiões com pequenas ORFs. A deleção desta região impede a repressão produzida pela sacarose, mostrando que este açúcar é sinalizador específico no controle da tradução do gene em questão. Possivelmente, neste sistema, é a entrada de sacarose na célula que funciona como sinalizador e não a sacarose já presente no meio citossólico, já que plântulas de *Arabidopsis thaliana* sintetizam sacarose quando glicose e frutose são adicionados e isso não provoca sinalização (Dijkewel et al., 1996).

Como descrito anteriormente, os dados obtidos nos sugerem a ocorrência de 5 genes regulados especificamente por sacarose, indicando a existência de uma sinalização restrita ao sinal deste açúcar. O exemplo aqui demonstrado desta regulação específica é o ABC transporter (SCCCAM1001A03.g), induzido apenas por sacarose em cana-de-açúcar. Este gene, embora seu ortólogo em Arabidopsis (AT3G28860) não se mostre regulado, apresenta um gene relacionado em um clado irmão (AT2G36910) (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=34239&type=locus) também regulado positivamente e especificamente por sacarose em Arabidopsis (Figura 20). Este gene pertence a família de ABC tansporters e também é conhecido como AtMDR1. Dados na literatura mostram que está envolvido, possivelmente, com a regulação de transporte de auxina na raiz (Kramer et al., 2006).

6. Genes diferencialmente expressos em resposta à sacarose no chip SUCAST

Nesta parte do trabalho, foram realizadas análises preliminares mais abrangentes dos genes regulados pela sacarose para avaliar a conservação evolutiva da via de sinalização deste dissacarídeo em angiospermas.

Para tanto foi usada a tecnologia de microarranjos de DNA e, a partir da utilização do chip SUCAST (descrito em M&M), procuramos comparar a regulação por açúcares entre os SAS de cana-de-açúcar e seus genes ortólogos e homólogos relacionados em *Arabidopsis thaliana*.

Para identificar genes diferencialmente expressos, fragmentos amplificados de cDNA referentes a 1.545genes envolvidos em vias de transdução de sinais foram hibridizados com sondas fluorescentes gerados a partir de amostras de plantas controles e tratadas com sacarose, gerando dois experimentos biológicos (experimento e réplica biológica).

A tabela 6 mostra o desenho experimental conduzido para a análise do perfil de expressão dos genes do chip SUCAST que são diferencialmente expressos a partir do tratamento de plântulas de cana-de-açúcar com sacarose 3% por 4 horas.

Tabela 6. Desenho experimental conduzido para a realização das hibridizações das amostras de cDNA de plântulas de cana-de-açúcar utilizando o chip SUCAST

Plântulas de cana-de-açúcar					
Alexa Fluor® 555	Alexa Fluor® 647				
Cy3	Cy5				
Controle (S-1)	Sacarose 3% (S+1)				
Sacarose 3% (S+1sw)	Controle (S-1sw)				

Os cDNAs obtidos a partir dos RNAs extraídos de plântulas de cana-de-açúcar com 13 dias de idade controles (S-1 e S-1sw) e tratadas com 3% de sacarose por 4 horas (S+1 e S+1sw) foram hibridizados utilizando-se o CHIP SUCAST (descrito em M&M). A marcação dos cDNAs foi feita utilizando-se os fluoróforos Alexa Flúor 555 e Alexa Flúor 647, correspondentes a Cy3 e Cy5, respectivamente. S-1 indica experimento 1 contole; S+1, experimento 1 tratado; S-1sw, réplica biológica controle e S+1sw, réplica biológica com tratamento. A réplica biológica considera a inversão do fluoróforo para controle tratado.

Os dados dos experimentos de microarranjos são visualizados em um gráfico do tipo MxS, onde M representa o valor logarítmico (na base 2) da razão de expressão normalizada entre a amostra experimental (tratada com sacarose 3%) e a controle (sem tratamento com sacarose) e S representa o valor logarítmico (na base 2) da média dos valores de intensidade normalizados nos dois canais (Cy3 e Cy5) para cada um dos pontos de microarranjos (Figuras 34 e 35).

Para a determinação dos parâmetros a serem utilizados na identificação dos genes diferencialmente expressos, adotou-se o método HT-self (Vencio & Koide, 2005). Para isso, os dados M x S referentes a cada lâmina foram usados para gerar intervalos de razão dependentes da intensidade, com intervalo de credibilidade de 80%, referente aos genes sem expressão diferencial significativa em relação ao controle. Após a definição desses intervalos de credibilidade os mesmos foram usados para determinar quais são os genes que possuem 60% ou mais de seus pontos-réplica (várias réplicas de cada gene na lâmina) acima ou abaixo desses intervalos. Como critério para se definir genes diferencialmente expressos, adotou-se o método de busca de valores extremos, os outliers (Koide et al., 2006). Este método utiliza os dados de cada experimento isoladamente para definir curvas de corte intensidade-independentes. Assim é possível detectar os genes com alta expressão diferencial (outliers) em relação ao intervalo de credibilidade. Este método foi adotado para os experimentos, pois para essas hibridizações, notou-se que alguns pontos do gráfico MxS podem estar deslocados mais para a direita ou mais para a esquerda no eixo x e a dispersão dos pontos no eixo y pode ser maior ou menor dependendo do experimento. Em linhas gerais, o software é mais apropriado para análises de experimentos com poucas réplicas biológicas, pois possui apropriada normalização da razão de expressão, utiliza um método não paramétrico mais sensível na identificação dos *outliers* e, principalmente, em virtude do nível de intensidade das lâminas (possuem muita variação de lâmina para lâmina) (Figuras 34 e 35). Um gene foi considerado diferencialmente expresso quando obteve resultado consistente nas duas réplicas biológicas analisadas para cada experimento.



Figura 34. Gráfico M x S, normalização dos dados e intensidade dos fluoróforos para dois experimentos comparando-se a expressão de genes a partir de uma situação controle e um tratamento com sacarose 3%. A-) Dispersão dos pontos no gráfico M X S com os dados normalizados a partir do método LOWEES (Yang *et al.*, 2002b) para os experimentos 1 (S+1 vs CONTR) e 2 (S+1sw vs CONTR) de microarranjos. M= log₂ (Cy3/Cy5), a razão da expressão no eixo y e S= log₂ [(Cy3/Cy5)/2], a intensidade do sinal no eixo x, como descrito em M&M. B-) Valor da intensidade de Cy3 (eixo das abscissas) e Cy5 (eixo das ordenandas) para o experimento 1 (S+1) e para o experimento 2 (S+1sw). C-). Gráfico M x S antes da normalização LOWEES, mostrando uma dependência não linear entre a razão de intensidades e a intensidade média, onde as observações não estão centradas em M=0 (que significa ausência de mudança para a maioria dos genes medidos). A curva é o ajuste LOWEES utilizado para corrigir estes artefatos. (S+1= Experimento 1 e S+1sw= Experimento 2 ou réplica biológica).



Figura 35. Dispersão dos pontos no gráfico M x S para os experimentos de microarranjos. O grafico M x S é mostrado para os dois experimentos de tratamento com sacarose 3%, evidenciando perfis diferentes quanto às dispersões dos pontos nos eixos x e y. As curvas dependentes de intensidade foram ajustadas para as duas lâminas, com critério p=0.8. Essas curvas foram adotadas para a definição de genes diferencialmente expressos.

Os resultados obtidos a partir das hibridizações no CHIP SUCAST mostram que 55 genes aparecem diferencialmente expressos em resposta a sacarose, correspondendo a 3,6% do número de genes totais do chip. Os 55 genes incluem 25.6% de proteínas quinases e fosfatases, 16.5% de fatores de transcrição, 15% de receptores, 4% de GTPases, 7.5% de genes distribuídos entre metabolismo de cálcio, carboidrato, DNA e lipídios, 5.5% de genes relacionados a estresse, 7.5% de genes entre ligantes de RNA, ubiquitinação, senescência e fitase e 20% entre no matches e proteínas desconhecidas (Figura 36).



Figura 36. Distribuição e número de genes diferencialmente expressos em resposta à sacarose segundo a categoria funcional na qual estão incluídos no CHIP SUCAST. O número de genes diferencialmente expressos em cada categoria funcional está indicado ao lado da legenda. No gráfico pizza, encontramos asporcentagem de genes diferencialmente expressos nas devidas categorias funcionais.

Destes 55 genes diferencialmente expressos, 9 deles se apresentaram reprimidos e 46 mostraram-se induzidos por sacarose. A Tabela 7 mostra os genes diferencialmente expressos, categorias e subcategorias funcionais nas quais estão incluídos e a razão de expressão desses genes (*up/down*) no microarranjo.

6.1. SAS reprimidos por sacarose no chip SUCAST

Dos genes reprimidos, temos três receptores serina-treonina quinases (SCBFSB1048C08.g, SCMCCL6052C09.g, SCQSLR1061E06.g), dois fatores de transcrição (SCACLR2029F03.g, SCSFAD1070F08.g) dois genes envolvidos em resposta a patógenos (SCACCL6009G07.g, SCCCLR1077F09.g), uma inositol quinase (SCCCRZ2001A10.g) e uma inositol fosfatase (SCSBST3096H04.g) (Tabela 7).

6.2. SAS induzidos por sacarose no chip SUCAST

A lista de elementos induzidos por sacarose é composta por 46 genes, que inclui 12 quinases distribuídas entre as subcategorias SNF, MAPK e algumas sem subcategoria definida (SCACHR1040D12.g, SCAGLB2046F06.g, SCBFSB1046D04.g, SCCCLR1072F12.g, SCCCLR1C01H09.g, SCEQRT1027E02.g, SCEZRZ1015D09.g, SCJLLR1054C03.g, SCQGLR2017B03.g, SCVPFL3048G05.g e mais duas em SASs não identificados); sete fatores de transcrição distribuídos entre as subcategorias HLH, REBP, LIM, MYB, zinc finger, jmjC (SCBGLR1002A09.g, SCCCRZ3002D03.g, SCEPRZ1008A04.g, SCMCAM1100D08.g, SCQSLB1052B11.g, SCRLRZ3041C03.g e SCSBST3101E05.g); cinco receptores, sendo que quatro deles são serina-treonina quinases e uma histidina quinase (SCAGAM2125C01.g, SCBFFL4114B06.g e três com SASs indefinidos), duas pequenas GTPases (SCCCLR1066D10.g, SCJFRT1059D05.g), quatro envolvidos em metabolismo de cálcio, carboidrato, DNA e lipídio genes (SCCCAM1001A03.g, SCCCCL1002D10.b, SCCCLR2002D04.g, SCRUSB1062E12.g); um gene relacionado à senescência (SCJFSB1010G10.g), outro a ubiquitinação (SCRFLB1056F07.g) e outro a estresse (SCUTST3084F06.g), ainda uma proteína ligante a RNA (SCCCLR1C07B07.g), uma fitase (SCEPSD2004C09.g) e mais onze genes entre desconhecidos matches (SCBFSD1035H11.g, SCBGLR1115D10.g, e no
SCCCCL1001H07.b, SCCCRZ2C03B08.g, SCCCSD1091H06.g, SCRFHR1006H10.g, SCRUAD1063D03.g, SCSGLR1025H02.g, SCUTLR1058C02.g, SCUTSD2085H06.g e mais um SAS desconhecido) (Tabela 7). Para mostrarmos que os genes diferencialmente expressos eram devido ao sinal sacarose e não a uma resposta osmótica, também fizemos duas hibridizações a partir de dois experimentos distintos de plântulas controle e tratadas com manitol 3% (Tabela 8). Podemos notar que nenhum dos SAS diferencialmente expressos para tratamento com manitol é regulado por sacarose, indicando que a resposta à sacarose é específica deste sinal e não a uma mudança osmótica.

SAS	categoria	subcategoria 1	subcategoria 2	Sacarose cana-de-açúcar	Glicose e/ou Sacarose Arabidopsis thaliana	
SCACCL6009G07.g	pathogenicity	R-gene	NBS-LRR	down [2.20381,6.9644]	monocot-específico	relacionado AT3G09010
SCACHR1040D12.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneCIPK-15	up [3.34035,4.59479]	monocot-específico	relacionado AT5G45820
SCACLR2029F03.g	transcription factor	MADS	Agamous-like MADS box protein (AGL9)	down [1.84805,3.5801]	ortólogos não regulados	próximo AT2G03710
SCAGAM2125C01.g	receptor	receptor Ser/Thr kinase	caneRLK-D16	up [2.65737,5.54044]	no hit	
SCAGLB2046F06.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneCIPK-22	up [2.17347,3.83706]	ortólogo AT5G45810	
SCBFFL4114B06.g	receptor	receptor Ser/Thr kinase	caneRLK-DIII3	up [4.56306,4.02782]	monocot-específico	relacionado AT4G22730
SCBFSB1046D04.g	protein kinase	SNF-like kinase	caneCIPK-16	up [2.60268,3.38698]	monocot-específico	relacionado AT5G45820
SCBFSB1048C08.g	receptor	receptor Ser/Thr kinase	caneS receptor-23	down [1.88557,4.16986]	monocot-específico	
SCBFSD1035H11.g	no match	•		up [2.60268,7.72749]	no hit	
SCBGLR1002A09.g	transcription factor	related/ethylene/AP2/ER EBP	DRE binding factor 2	up [2.96905,7.83536]	ortólogo AT1G	36060
SCBGLR1115D10.g	no match	non-coding		up [1.95342,2.49666]	no hit	
SCCCAM1001A03.g	calcium metabolism	calmodulin-binding protein	Multidrug resistant (MDR) ABC transporter	up [3.68075,14.2215]	próximo AT2G36910 induzido por sacarose	
SCCCCL1001H07.b	no match			up [1.87384,1.53688]	no hit	
SCCCCL1002D10.b	carbohydrate metabolism	TCA	E1 alpha subunit	up [2.58471,3.70635]	ortólogo não regulado	relacionado AT1G24180
SCCCLR1066D10.g	small GTPase	factor)	ARF1	up [2.25012,2.78949]	ortólogos AT1G10630/ AT1G70490	ortólogo AT3G62290
SCCCLR1072F12.g	protein kinase	undefined	canePK-BI3	up [2.90794,5.50217]	ortólogos não regulados	
SCCCLR1077F09.g	two component relay	response regulator (ARR- like)	Pseudo-response regulator	down [2.62079,3.73213]	ortólogo AT5G24470	
SCCCLR1C01H09.g	protein kinase	MAPK/MAPKK/MAPKKK	caneNPK1-3	up [2.75108,12.295]	monocot-específico	relacionado AT5G55090
SCCCLR1C07B07.g	other		protein	up [1.76052,4.22807]	ortólogos não regulados	
SCCCLR2002D04.g	DNA metabolism	histone	Histone H4	up [2.47942,4.16986]	no hit	
SCCCRZ2001A10.g	inositol metabolism	inositol kinase	i-Phosphatidylinositol 4- kinase	down [2.28153,2.92817]	ortólogos não regulados	
SCCCRZ2C03B08.g	unknown protein			up [2.82843,2.86791]	no hit	
SCCCRZ3002D03.g	transcription factor	LIM (protein-protein interaction)	LIM transcription factor	up [3.65533,5.02805]	ortólogo não regulado	relacionado AT3G55770
SCCCSD1091H06.g	no match	non-coding		up [2.37841,6.9644]	no hit	
SCEPRZ1008A04.g	transcription factor	related/ethylene/AP2/ER EBP	BTH-induced ERF transcriptional factor 4	up [2.54912,1.8609]	monocot-espec	fico
SCEPSD2004C09.g	other		Phytase	up [2.37841,2.96905]	no hit	
SCEQRT1027E02.g	protein kinase	calcium-related	caneCDPK-9	up [2.54912,10.7779]	ortólogo AT5G	04870
SCEZRZ1015D09.g	protein kinase	putative RLCK	caneRLCK-AVIII1	up [2.60268,7.78124]	próximos AT205940/ AT2G26290	AT5G01020

Tabela 7. Lista de SAS, categorias, subcategorias e ratio (valor *up/down*) que se mostraram diferencialmente expressos no chip SUCAST em resposta a sacarose 3%.

,						
SAS	categoria	subcategoria 1	subcategoria 2	Sacarose cana-de-açúcar	Glicose e/ou Sacarose Arabidopsis thaliana	
SCJFRT1059D05.g	small GTPase	rab	Ras family GTP-binding protein	up [2.94854,5.35171]	ortólogos não regulados	relacionados AT4G18430/AT4G18800
SCJFSB1010G10.a	development	senescence-associated	Senescence-associated protein 15	up [2.67586.4.72397]	ortólogo pão re	gulado
SC.II.I.B1054C03.g	protein kinase	undefined	canePK-BIII7	up [3 03143 5 9794]	ortólogo não regulado	
0002EI(1004000.g	protein kinase	ImiC (jumonji domain-	I ranscription factor	up [0.00140,0.9794]	or tologo had re	gulado
SCMCAM1100D08.g	transcription factor	containing protein)	jumonji	up [2.42839,6.06287]	no hit	
SCMCCL6052C09.g	receptor	receptor Ser/Thr kinase	caneRLK-C1 (LTK)	down [1.428,1.53368]	ortólogo não regulado	relacionado AT5G58940
SCQGLR2017B03.g	protein kinase	MAPK/MAPKK/MAPKKK	caneMAPK-18	up [3.31728,10.8528]	ortólogo AT30	622420
SCQSLB1052B11.g	transcription factor	HLH (helix-loop-helix)	factor-like	up [2.17347,6.1475]	monocot-específico	AT3G47620 / AT1G69690
SCQSLR1061E06.g	receptor	receptor Ser/Thr kinase	caneRLK-BI4	down [2.67586,3.91768]	monocot-específico	relacionado AT3G09010
SCRFHR1006H10.g	no match			up [2.44528,5.9794]	no hit	
SCRFLB1056F07.g	ubiquitination	E3 ubiquitin ligase	SKP1	up [1.98618,4.05584]	ortólogo não regulado	relacionados AT1G20140/ AT2G25700
SCRLRZ3041C03.q	transcription factor	MYB	GARP transfactor / MYB family transcription factor	up [2.39496,4.11246]	monocot-específico	relacionado AT3G04030
SCRUAD1063D03.g	no match			up [2.63902.5.85634]	no hit	
		-	Putative triacylglycerol	-h [no nit	
SCRUSB1062E12.g	lipid metabolism		lipase	up [2.11404,3.11666]	monocot-específico	relacionados AT5G18640/AT5G18630
			trisphosphate 5-			
SCSBST3096H04.g	inositol metabolism	inositol phosphatase	Phosphatase	down [1.8,2.63902]	ortólogo não re	gulado
SCSBST3101E05.g	transcription factor	zinc finger protein	C3H	up [2.49666,5.73582]	ortólogo não regulado	relacionado AT1G32360
SCSFAD1070F08.g	transcription factor	NAM (no apical meristem)	OsNAC7 protein	down [1.68413,2.92817]	no hit	
SCSGLR1025H02.g	unknown protein			up [2.47942,10.2674]	monocot-exclusivo	
SCUTLR1058C02.g	unknown protein			up [2.42839,4.08405]	ortólogos não regulados	
SCUTSD2085H06.g	no match			up [2.49666,4.11246]	no hit	
SCUTST3084F06.g	stress	drought and cold response	Low temperature induced (LTI)	up [2.2974,4.99332]	ortólogo/AT3G05880	ortólogo AT3G05890
			canePK-E6 (non phototropic hypocotyl 1-			
SCVPFL3048G05.g	protein kinase	undefined	related)	up [2.28153,5.85634]	ortólogos não reg	gulados
	nomatch	·		up [3.38698,7.1602]	no hit	
UNKNOWN306	receptor	receptor Ser/Thr kinase		up [3.605,4.95883]	no hit	
			located transmembrane receptor protein			
unknown311	protein kinase	other	kinase/ribonuclease)	up [2.42839,8.22491]	no hit	
unknown314	receptor	receptor Ser/Thr kinase	caneRLK-B6	up [3.5801,2.80889]	no hit	
unknown342	protein kinase	undefined	canePK-EI2 (pkinase C)	up [3.03143,7.11074]	no hit	
unknown90	receptor	histidine kinase receptor	similar to Ethylene receptor	up [2.94854,9.57983]	no hit	

Continuação da tabela 7

A primeira coluna mostra a identificação do SAS, seguida da categoria e subcategorias nas quais os genes estão incluídos. A quinta coluna mostra a regulação dos gene em cana-de-açúcar e a sexta coluna as relações de ortologia entre o SAS de cana e genes de Arabidopsis. Os genes de Arabidopsis são identificados pelo nome AGI e categorizados funcionalmente pela anotação do banco de dados TAÍR (www.arabidopsis.org). O preenchimento em vermelho indica indução e o preenchimento em verde indica repressão. Tabela adaptada do site SUCESTFUN (http://sucestfun.iq.usp.br) 111

SAS (genes)	Categoria	Subcategoria 1	Subcategoria 2
Induzidos			
SCEQLR1007G03.q	Calcium	Calmodulin-binding proteins	EF-1 alpha
SCJLRT1006G01.g	Calcium	Calmodulin-binding proteins	EF-1 alpha
SCCCRZ1C01E03.g	Cell cvcle	CDCs	cdc21
SCEQLB1065B08.g	Cell cvcle	Others	Cell cycle switch protein
SCJFRZ2007F10.g	Development	ARC1 (arm repeat protein)	· · · · · · · · ·
SCCCLR1048D07.g	Hormone biosynthesis	Salicylic Acid	
SCJFST1016F01.b	Hormone related	Auxin	Auxin transport / auxin eflux carrier
SCCCLR1024E05.g	No matches		· · · · · · · · · · · · · · · ·
SCCCLR1001D09.g	No matches		
SCCCCL5004D02.g	No matches		
SCJFST1009H11.g	No matches		
SCRUFL1117G08.a	No matches		
SCSBFL4062G06.g	Others	Putative transposon polyprotein	
SCSBAD1084C01.g	Others	Tubulin alpha-1 chain	
SCEZLR1009F06.g	Others	Pyruvate dehydrogenase	
SCCCCL4002E02.q	Others	Extensin	
SCCCRT2001D10.g	Others	Putative phenylalanyl-tRNA synthetase beta-subunit	
SCCCFL5062E01.g	Pathogenicity	R-genes (receptors)	With LRR / NBS-LRR
SCEPLR1030B03.g	Pathogenicity	R-genes (receptors)	With LRR / Tomato LRP protein
SCCCLR1065F03.g	Pathogenicity	R-genes (receptors)	With LRR / NBS-LRR
SCSFAD1125C08.g	Pathogenicity	Polygalacturonase-inhibiting	
SCACLR2022A05.g	Protein kinases	S6 ribosomal-like	
SCEQAM1041C05.g	Protein kinases	Undefined	
SCCCCL5002B10.g	Protein kinases	Undefined	
SCCCLB1003E11.g	Protein kinases	Others	REK-like
SCCCLR2001B06.g	Protein Phosphatases	Serine/Threonine - PPP Family	PP1 Catalytic Subunit
SCEQRT1033D12.g	Receptors	Receptor Ser/Thr kinase	RLK Undefined
SCJFRZ2033A09.g	Receptors	Receptor Ser/Thr kinase	RLK Undefined
SCRFAD1024G05.g	Receptors	Receptor Ser/Thr kinase	BRI1
SCSGFL4191G08.b	Receptors	Receptor Ser/Thr kinase	S-receptor
SCCCRT1001E12.g	Small GTPases	Rab	
SCBGLR1117A05.g	Small GTPases	Ran	
SCQGHR1012B09.g	Stress	Probable cytochrome P450 monooxygenase	
SCVPLR2027D02.g	Stress	Wound-induced	Chalcone synthase
SCJLRZ1024H09.g	Stress	Drought-induced	
SCAGFL1089C03.g	Stress	Glutathione S-transferases	
SCCCLR1048A06.g	Stress	Superoxide dismutases	yn
SCCCCL7002A04.g	Transcription	AP2/EREBP	EREBP1
SCEQLB1067E03.g	Two component	Response regulators (ARR-like)	
SCJFLR1035B03.g	Two component	Response regulators (ARR-like)	
SCRFLR2038D12.g	Unknown protein		
Reprimidos			
SCEQSB1C01F10 g	Pathogenicity	R-genes (receptors)	With LRR / NBS-LRR
SCVPCL6045H11.a	Protein kinases	RLCK	PBS1-like
SCJLRZ1023H04.q	Protein kinases	Calcium-related	CBL-interacting

Tabela 8. SAS responsivos ao manitol.

A primeira coluna identifica os SAS responsivos a tratamento de plântulas de cana-de-açúcar com manitol 3%, utilizado como controle de efeito osmótico. As demais colunas indicam categoria e subcategorias nas quais estes genes estão incluídos segundo o Catálogo SUCAST. Podemos notar que nenhum dos SAS diferencialmente expressos para tratamento com manitol aparece nos SAS regulados por sacarose, indicando que a resposta destes últimos são devido ao sinal sacarose. Para a validação de alguns dos resultados obtidos com as hibridizações de amostras de plântulas tratadas com sacarose, implementou-se a tecnologia de qRT-PCR. A amostra de RNA utilizada nas reações de PCR em tempo real provém de um terceiro experimento biológico, ou seja, é diferente das duas amostras de RNA utilizadas para os experimentos com microarranjos. Foram utilizadas buscas utilizando o algoritmo BLAST contra o banco de dados do SUCEST utilizando as seqüências dos *primers* utilizados para validação com o intuito de se verificar a especificidade do anelamento dos *primers* selecionados para análise de qRT-PCR. Adicionalmente, após as reações de PCR em tempo real, são geradas para cada uma das reações, curvas de dissociação permitindo verificar a especificidade do produto de PCR gerado pela existência de um único pico nas curvas obtidas.

Sete genes foram selecionados para a validação dos dados de expressão para plântulas tratadas com sacarose. Os genes selecionados, bem como os *primers* desenhados para esses genes encontram-se na Tabela 2 (M&M).

Dos sete genes selecionados, quatro deles foram validados, pois apresentaram o mesmo perfil de resposta à sacarose no microarranjo e na reação de qRT-PCR (Figura 37). Os genes validados são: dois induzidos por sacarose (SCCCAM1001A03.g, um ABC transporter e SCCCRZ3002D03.g, um fator de transcrição LIM) e dois reprimidos por sacarose (SCSBST3096H04.g, uma inositol fosfatase e SCSFAD1070F08.g, um ARR-like) (Figura 37).



Figura 37. Validação por PCR em tempo real da regulação de quatro genes que se mostraram diferencialmente expressos a partir do CHIP SUCAST. No eixo das abscissas temos a identificação do SAS escolhido para validação. No eixo das ordenadas temos a quantificação da expressão dos experimentos tratados com sacarose 3% (S+) em relação ao experimento controle (S-). O valor P corresponde à probabilidade Pr (Tratrado>Controle) e Pr (Tratado<Controle), para genes induzidos e reprimidos, respectivamente. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando P \geq 0.95. Para todos os casos, o valor P=1.

7. Análise comparativa entre a regulação por sacarose e/ou glicose de genes em canade-açúcar e seus genes ortólogos ou homólogos relacionados em *Arabidopsis thaliana*.

Com o objetivo de complementar a avaliação da conservação da sinalização por açúcares entre monocotiledôneas e eudicotiledôneas, compararmos a regulação por sacarose entre genes de cana e seus ortólogos e/ou homólogos relacionados em Arabidopsis thaliana. Desta forma, de maneira idêntica a análise comparativa realizada na parte I, foi feita uma busca utilizando-se o programa tblastx (Altcchul et al., 1997) para cada següência dos SAS regulados por sacarose contra um banco de proteínas contendo o proteoma predito de todos os genomas completos disponíveis de plantas verdes. As quarenta primeiras seqüências apresentando a maior similaridade com cada SAS foram selecionadas para procedermos a uma análise filogenética usando o método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), com distâncias calculas por *p*-distance (Nei & Kumar, 2000). Este processo possibilitou a identificação das prováveis següências ortólogas em Arabidopsis thaliana de cada SAS de cana-de-açúcar analisado. Os genes ortólogos e os genes homólogos mais próximos de Arabidopsis thaliana foram comparados com o conjunto de genes de Arabidopsis regulados por glicose e/ou sacarose em condições similares aquelas usadas nas nossas análises e que são disponíveis na literatura (M&M). Em seguida, uma apresentação mais detalhada dos vários SAS e seus homólogos de Arabidopsis será apresentada.

Os dados obtidos para os 55 genes de cana que se mostraram diferencialmente expressos no chip SUCAST indicaram que apenas 36 deles apresentaram genes homólogos em *Arabidopsis thaliana* (Tabela 7). Pois, para 19 dos SAS não foram encontradas seqüências com grau de similaridade significativo (*e-value* maior que 1e⁻⁵) com seqüências de Arabidopsis e demais plantas, sugerindo que estes SAS correspondem a seqüências cana-específicas. Destes 36 SASs, 12 parecem pertencer a um grupo de seqüências restritas a monocotiledôneas e que podem, portanto, ser definidas como monocotiledôneas específicas. 23 SAS apresentam genes ortólogos em Arabidopsis e para um SAS encontramos genes homólogos relacionados em Arabidopsis em que as relações de ortologia não estão bem claras.

7.2. SAS que apresentam genes ortólogos em Arabidopsis thaliana.

23 SAS apresentam genes ortólogos em *Arabidopsis thaliana* dos quais apenas 7 genes ortólogos são também regulados por sacarose e/ou glicose. Um exemplo de grupo de ortólogos de monocotiledôneas e eudicotiledôneas está ilustrado na Figura 38. Neste caso, o SAS SCACLR2029F03.g está incluindo em um grupo de seqüências de monocotiledôneas e este grupo está relacionado ao grupo seqüências de eudicotiledôneas, formando assim um grupo de ortólogos de *monocots* e *eudicots*, em que o gene de *Arabidopsis thaliana AT1G24260* é ortólogo deste SAS de cana.

7.2.1. SAS que apresentam ortólogos em *Arabidopsis thaliana* que não são regulados por acúcar

Os 16 SAS cujos ortólogos de *Arabidopsis thaliana* não apresentam regulação são: SCACLR2029F03.g, fator de transcrição; SCCCRZ2001A10.g, uma inositol quinase; SCMCCL6052C09.g, receptor serina-treonina quinase; SCSBST3096H04.g, uma inositol fosfatase (reprimidos); SCCCAM1001A03.g, um ABC transporter; SCCCCL1002D10.b, uma piruvato desidrogenase; SCCCLR1072F12.g, proteína quinase; SCCCLR1C07B07.g, gene que codifica para uma proteína ligante de RNA; SCCCRZ3002D03.g, fator de transcrição da família LIM; SCJFRT1059D05.g, pequena GTPase da família ras; SCJFSB1010G10.g, gene relacionado à senescência; SCJLLR1054C03.g, proteína quinase; SCRFLB1056F07.g, uma ubiquitina; SCUTLR1058C02.g, uma proteína desconhecida, SCSBST3101E05.g, um fator de transcrição da família zinc finger e SCVPFL3048G05.g, um outro gene que codifica para um proteína quinase (SAS induzidos) (Tabela 7).

Alguns SAS, embora não apresentem genes ortólogos de *Arabidopsis thaliana* regulados por sacarose e/ou glicose, possuem genes homólogos relacionados em Arabidopsis regulados por estes açúcares. Um exemplo é o gene do ABC *transporter* (SCCCAM1001A03.g), induzido por sacarose, que apresenta o gene homólogo relacionado de Arabidopsis *AT2G36910*, também induzido pelo sinal sacarose (Figura 20-anexo). Considerando que todos os 24 genes analisados na abordagem anterior referente a genes envolvidos em sinalização rápida por açúcar e relacionados a acúmulo de sacarose encontram-se no chip SUCAST, um aspecto interessante deste SAS é que ele é o único em comum entre os experimentos de microarranjos e os genes relacionados a acúmulo de sacarose. Este fato mostra uma fraca sobreposição entre esses dois experimentos, podendo ser indicativo de níveis de sensibilidade distintos entre as técnicas de qRT-PCR e de microarranjos.

Outros genes que não apresentam seus ortólogos de *Arabidopsis thaliana* regulados por açúcar são o fator de transcrição da família MAD (SCACLR2029F03.g) e o receptor serina-treonina quinase (SCMCCL6052C09.g). Estes SAS são reprimidos em cana-de-açúcar, contudo apresentam, respectivamente, os genes homólogos relacionados,

117

AT2G03710 e *AT5G58940* em *Arabidopsis thaliana*, induzidos por glicose e/ou sacarose, mostrando uma aparente divergência na regulação desses genes (Figuras 38 e 39 do anexo).

Os genes da piruvato desidrogenase (SCCCCL1002D10.b), da pequena GTPase (SCJFRT1059D05.g) e da ubiquitina-ligase (SCRFLB1056F07.g), induzidas por sacarose em cana-de-açúcar, embora não possuam genes ortólogos regulados por açúcar em *Arabidopsis thaliana* apresentam, respectivamente os genes homólogos relacionados em Arabidopsis, *AT1G24180*, *AT4G18430/AT4G18800* e *AT1G20140/ AT2G25700*, também induzidos por glicose e/ou sacarose, mostrando conservação da regulação por açúcar entre estes SAS e os genes homólogos relacionados de Arabidopsis (Figuras 40, 41 e 42-anexo).

Já os fatores de transcrição da família LIM e da família *zinc finger* (SCCCRZ3002D03.g e SCSBST3101E05.g), induzidos em cana, apresentam, respectivamente, os genes homólogos relacionados *AT3G55770* e *AT1G32360*, reprimidos por glicose e/ou sacarose em Arabidopsis, indicando divergência aparente (Figuras 43 e 44-anexo).

7.2.2. SAS que apresentam ortólogos em Arabidopsis thaliana regulados por acúcar

Com relação aos 7 SAS que apresentam genes ortólogos em *Arabidopsis thaliana* também regulados por sacarose e/ou glicose, 3 deles apresentam genes ortólogos com mesmo sentido de resposta, 2 deles com sentido de resposta oposto e outros 2 que apresentam ortólogos tanto com mesmo sentido quanto com sentido oposto de resposta.

Os SAS que apresentam genes ortólogos com mesmo sentido de resposta correspondem a um *pseudo-response-regulator* (SCCCLR1077F09.g), uma SNF quinase caneCIPK-22 (SCAGLB2046F06.g) e uma proteína quinase cálcio-relacionada (SCEQRT1027E02.g) (Tabela 7). O gene *pseudo-response-regulator*, reprimido por

118

sacarose em cana-de-açúcar, apresenta o ortólogo *AT5G24470* também reprimido por glicose e sacarose em *A. thalina* (Figura 45-anexo). A proteína quinase cálcio-relacionada, induzida por sacarose em cana, apresenta o gene ortólogo *AT5G04870* de *Arabidopsis thaliana* também induzido por sacarose (Figura 46-anexo). A SNF quinase caneCIPK-22, induzida por sacarose em cana, apresenta o gene ortólogo *AT5G45810* induzido por glicose (Figura 47-anexo).

Os SAS que apresentam genes ortólogos em *Arabidopsis thaliana* com sentido oposto de resposta correspondem ao fator de transcrição relacionado a etileno (SCBGLR1002A09.g) e a proteína quinase caneMAPK-18 (SCQGLR2017B03.g). Ambos são regulados positivamente por sacarose em cana e seus ortólogos de Arabidopsis, *AT1G36060* e *AT3G22420* são reprimidos por glicose e sacarose nesta eudicotiledônea (Figuras 48 e 49-anexo).

Os SAS correspondentes a uma pequena GTPase ARF1(SCCCLR1066D10.g) e a um LTI (*Low Temperature Induced*) (SCUTST3084F06.g) apresentam tanto genes ortólogos de Arabidopsis com mesmo sentido como genes ortólogos com sentido contrário de resposta. A GTPase, induzida por sacarose em cana, apresenta os genes ortólogos de Arabidopsis *AT1G10630* e *AT1G70490* também induzidos por sacarose, enquanto o gene ortólogo *AT3G62290* apresenta uma resposta oposta sendo reprimido por sacarose (Figura 50-anexo). O gene LTI, regulado positivamente por sacarose, apresenta o ortólogo *AT3G05890* induzido por glicose e o ortólogo *AT3G05880* reprimido por sacarose (Figura 51-anexo).

7.2.3. SAS monocotiledônea específicos

Encontramos 12 SAS que, aparentemente estão incluídos em grupos de homólogos que são monocotiledônea-específicos, uma vez que não apresentam ortólogos em organismos eudicotiledônea. Um grupo monocot-específico é definido quando temos um grupo com representantes exclusivos de monocotiledôneas e um grupo de ortólogos de monocotiledôneas e eudicotiledôneas relacionado. Os SAS que pertencem a grupos monocot-específicos são: SCACCL6009G07, gene relacionado à patogenicidade; SCBFSB1048C08 e SCQSLR1061E06 (caneRLK-BI4), receptores serina-treonina quinases (reprimidos); SCBFFL4114B06.g (caneRLK-DIII3), gene receptor serinatreonina quinase; SCACHR1040D12 (caneCIPK-15), SCBFSB1046D04 (caneCIPK-16), SCCCLR1C01H09 (caneMPK1), genes codificantes para proteínas quinases; SCEPRZ1008A04, SCQSLB1052B11.g (HLH), SCRLRZ3041C03.g (MYB), genes que codificam para fatores de transcrição e SCRUSB1062E12.g, uma triacilglicerol lipase (induzidos) (Tabela 7). Ainda temos um SAS induzido por sacarose, o SCSGLR1025H02, referente a uma proteína desconhecida, que parece ser exclusivo de monocotiledôneas (Figura 52-anexo). O gene relacionado à patogenicidade e o receptor serina-treonina quinase caneRLK-BI4 são reprimidos pelo sinal sacarose e possuem um mesmo gene homólogo relacionado em A. thaliana, o AT3G09010, induzido por este açúcar (Figuras 53 e 54-anexo). As SNF quinases cane CIPK-15 e caneCIPK-16, induzidas por sacarose, possuem o mesmo gene homólogo relacionado em Arabidopsis AT5G45820, reprimido por sacarose e por glicose (Figuras 55 e 56-anexo). O receptor serina-treonina quinase caneRLK-DIII3, induzido por sacarose, possui o gene homólogo relacionado em A. thaliana AT4G22730 induzido por glicose (Figura 57-anexo). A MAP quinase caneMPK1 é regulada positivamente por sacarose em cana e seu gene homólogo relacionado em Arabidopsis, AT5G55090, é também induzido por este açúcar (Figura 58-anexo). O fator de transcrição pertencente à família HLH é induzido em cana pelo sinal sacarose e seus genes homólogos relacionados em Arabidopsis, *AT3G47620* e *AT1G69690*, são respectivamente, reprimido por sacarose e induzido por glicose (Figura 59-anexo). O fator de transcrição da família MYB, induzido por sacarose em cana, possui um gene homólogo relacionado em Arabidopsis, o *AT3G04030*, regulado positivamente por glicose (Figura 60). A triacilglicerol lipase, induzida por sacarose em cana, possui os genes homólogos relacionados em Arabidopsis *AT5G18640* e *AT5G18630* reprimidos por sacarose e por sacarose, respectivamente (Figura 61-anexo).

7.2.4. SAS que apresentam genes homólogos relacionados em Arabidopsis thaliana.

Como discutido anteriormente, comparados com os casos em que as relações de ortologia entre genes de cana e Arabidopsis são claramente estabelecidas, existem situações em que tais relações não estão bem claras, contudo podemos inferir uma relação de ortologia provável. Esta ocorrência se aplica ao SAS SCEZRZ1015D09.g, uma proteína quinase, regulada positivamente por sacarose em cana, que apresenta 3 genes homólogos relacionados em *A. thaliana* também regulados por açúcar: *AT205940* e *AT2G26290*, induzidos por sacarose e o gene *AT5G01020*, reprimido por este açúcar (Figura 62-anexo).

8. Discussão

A análise das relações de ortologia apresentadas para os SAS diferencialmente expressos no chip SUCAST e genes de Arabidopsis nos mostrou que a partir de 36 SAS que mostraram similaridade significativa com seqüências de plantas, 16 deles apresentaram ortólogos em *Arabidopsis thaliana* e apenas 3 desses SAS apresentam ortólogos com resposta similar a tratamento com sacarose. Isto corresponde a aproximadamente 20% do total de SAS que apresenta genes ortólogos em Arabidospsis (16) e a aproximadamente 8% dos 36 SAS que apresentaram seqüências similares possíveis de serem comparadas. Estes números indicam uma divergência significativa em termos de regulação por glicose e/ou sacarose entre as angiospermas *Saccharum* spp e *Arabidopsis thaliana*, representantes de mono e eudicotiledôneas, respectivamente.

8.1. Ortólogos com mesmo sentido de resposta

Os SAS referentes a um pseudo-response regulator (SCCCLR1077F09.g), uma SNF quinase (SCAGLB2046F06.g) e a uma proteína quinase cálcio-relacionada (SCEQRT1027E02.g) apresentam genes ortólogos em Arabidopsis com mesmo sentido de resposta. Da mesma forma que discutido na parte I, genes aparentados e que exibem conservação em termos de regulação por açúcar podem desempenhar papel essencial em redes de sinalização carboidrato-relacionadas, sendo excelentes genes candidatos a estudos funcionais mais aprofundados. O gene pseudo response regulator, apresenta como ortólogo de Arabidopsis AT5G24470 0 gene (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=135985&type=locus) que corresponde ao PRR5 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5). Juntamente com o gene PRR1/TOC1, este gene pertence a uma pequena família de Pseudo Response Regulators envolvida em componentes de ritmos circadianos de Arabidopsis (Matsushika et al., 2007). Em plantas superiores, os ritmos circadianos estão envolvidos em uma série de processos biológicos que incluem movimento de órgãos como folhas e pétalas, abertura estomática, bem como controle da floração (Ito et al., 2008). A SNF quinase e a quinase relacionada a cálcio apresenta ortólogos Arabidopsis AT5G45810 os genes em (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=131696&type=locus) e AT5G04870 (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=134851&type=locus). Um dos mecanismos mais comuns na transdução de sinal é a fosforilação e desfosforilação de proteínas. Estes processos são característicos de quinases e fosfatases, proteínas envolvidas em uma série de regulações relativas ao funcionamento celular, como divisão, metabolismo e respostas a sinais externos, ou seja, participantes chaves em vias transducionais.

8.2. Ortólogos com sentido oposto de resposta

Os SAS referentes ao fator de transcrição DRE (SCBGLR1002A09.g) e à proteína MAP quinase (SCQGLR2017B03.g) representam genes ortólogos de Arabidopsis, cujos padrões de regulação em termos de sinalização por carboidratos são opostos. Respostas em sentidos opostos podem ser indicativas do grau de divergência que essas espécies atingiram na sinalização por glicose e sacarose. Esta grande plasticidade da regulação por sacarose de genes ortólogos de Arabidopsis thaliana e Saccharum spp possivelmente se deve a adaptações surgidas dentro dessas espécies durante a evolução das angiospermas, como por exemplo, a atuação desses genes em diferentes órgãos ou tecidos, o que pode ter conferido uma vantagem seletiva para essas linhagens de cana e Arabidopsis. De maneira complementar, pode-se sugerir que a regulação da expressão seja mais facilmente alterada, indicativo de que esta última evolui mais rapidamente do que a seqüência codificante. Devemos lembrar ainda que pelo fato de não termos todos os genes de cana identificados e representados no chip SUCAST, podemos estar analisando um gene com regulação oposta em relação à Arabidopsis e um outro gene, não identificado, pertencente à mesma família multigênica, pode apresentar mesmo sentido de resposta ao encontrado em Arabidopsis, indicando uma deficiência da amostragem dos genes de cana. O fator de transcrição DRE apresenta ortólogo AT1G36060 0 (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=30563&type=locus), que corresponde a um fator de transcrição pertencente à superfamília ERF/AP2. Membros desta família

apresentam importante papel na regulação da transcrição de genes envolvidos em crescimento, desenvolvimento e resposta a diversos estímulos externos (Nakano et al., 2006). A MAP quinase apresenta o ortólogo *AT3G22420* (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=37978&type=locus), membro de uma família de quinases denominada WNK, que também mostrou participar na regulação de ritmos circadianos.

8.3. Ortólogos com mesmo sentido e sentido oposto de resposta

O mesmo raciocínio descrito acima em termos de conservação e divergência de respostas a açúcar entre grupos de ortólogos pode ser aplicado no caso do SAS SCCCLR1066D10.g, uma GTPase e do SAS SCUTST3084F06.g, gene induzido por baixas temperaturas. Ambos apresentam tanto ortólogos com mesmo sentido de regulação quanto com sentido oposto de resposta a sacarose em *Arabidopsis thaliana*. O gene da GTPase, é induzido por sacarose em cana-de-açúcar e possui os gene ortólogos de *Arabidopsis AT1G10630*

(http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=28648&type=locus) e *AT1G70490* (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=29377&type=locus) também induzidos por sacarose. Já o terceiro gene ortólogo de Arabidopsis *AT3G62290* (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=39745&type=locus) é reprimido por sacarose. Todos esses genes ortólogos pertencem à famíla das GTPases ARF. As pequenas proteínas ligantes de GTP são moléculas capazes de serem ativadas por GTP e inativadas pela hidrólise de GTP a GDP. Os ciclos resultantes de ligação e hidrólise de GTP por essas pequenas proteínas constituem mecanismos regulatórios em células eucarióticas envolvidos, por exemplo, em proliferação celular, organização do citoesqueleto e transporte de membrana. As ARFs GTPases constituem uma classe de GTPases envolvidas

124

no transporte celular, principalmente, recrutando proteínas envoltórias no meio citosólico para a construção de vesículas de transporte. Entretanto, as ARFs apresentam outras funções como, alteração da composição de membranas lipídicas e remodelamento de compartimentos de membrana da célula (Donaldson, 2000). Sua atuação ocorre através de uma modificação pós traducional em sua porção amino-terminal, que permite uma interação fraca dessas proteínas com as membranas celulares (Franco et al., 1995). Tais modificações desempenham papel importante na interação dessas proteínas com a membrana e na transdução de sinais de plantas durante resposta ao estresse ambiental (Podell e Gribskov, 2004).

O gene LTI, induzido por sacarose em cana, apresenta os genes ortólogos de Arabidopsis *AT3G05890* (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=35605&type=locus) (RC12B)

induzido AT3G05880 por glicose e (http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=35623&type=locus) (RC12A), reprimido por sacarose. Os genes RC12A e RC12B correspondem a um apequena família de genes de Arabidopsis induzidos em resposta a baixas temperaturas. Ambos os genes codificam pequenas proteínas altamente hidrofílicas com alto grau de homologia entre elas. A expressão desses genes é regulada de forma transiente durante o período de aclimatação ao frio. R12A e RC12B também são induzidos por ABA e seca. Ainda mais, em condições de baixa temperatura, nos mutantes de Arabidopsis aba1 e abi1, esses genes também são induzidos, indicando que ambas as vias (ABA-dependente e ABA-independente) regulam a resposta dos genes R12A e RC12B sob baixas temperaturas (Capel et al., 1997). De forma complementar, Missok e colaboradores (2007) mostraram que em genes duplicados relacionados a desenvolvimento e estresses bióticos e abióticos o aumento da diversidade de expressão é maior quando comparados a outros genes do genoma.

9. Conclusões e Perspectivas

A primeira abordagem do trabalho nos mostrou a clara relação entre genes envolvidos em acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar e sinalização rápida por carboidratos. Dos 34 SAS relacionados a genótipos contrastantes para acúmulo de sacarose alto versus baixo brix e entrenó maduro versus imaturo, 24 mostraram-se envolvidos em redes de sinalização rápida por açúcar. Ao relacionarmos estes SAS aos genes evolutivamente relacionados em A.thaliana, encontramos apenas 6 SAS que apresentavam genes ortólogos nesta eudicotiledônea regulados por glicose e/ou sacarose num mesmo sentido (ambos induzidos ou ambos reprimidos nas duas espécies). Estas análises comparativas preliminares nos mostram uma divergência significativa em termos de regulação por açúcar entre as espécies Sacharum spp e Arabidopsis thaliana, angiospermas representantes das classes de mono e eudicotiledôneas, respectivamente. Dentre os SAS que apresentaram ortólogos de Arabidopsis com mesmo sentido de resposta à glicose e à sacarose, temos o IAA16, um fator de transcrição regulado por auxina. Nossos resultados de repressão por glicose e sacarose deste gene condizem com a via modelo de regulação por glicose em plantas a partir da interação deste açúcar com o hormônio auxina, reprimindo a expressão deste fator de transcrição, tornando este gene excelente candidato a estudos funcionais mais aprofundados, já que apresenta conservação da regulação por açúcar em um modelo de sinalização já conhecido, além de estar relacionado ao acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar. Duas SNFs quinases parálogas de cana-de-açúcar tem como ortólogo um único gene de Arabidopsis thaliana. Os três genes foram reprimidos por sacarose e glicose, sendo outra parte conservada, na via de sinalização a açúcares entre as duas espécies. Além disso, possuem o gene homólogo relacionado OST1, que codifica uma SNF quinase reguladora chave envolvida na via de transdução de sinal mediada por ABA nas células guarda, mostrando a interação dessas quinases em uma rede de sinalização que inclui açúcar e ABA. Um gene que se mostrou particularmente interessante foi a deidrina, que codifica uma proteína relacionada a estresse, principalmente à seca. Este gene apresentou mesmo sentido de resposta em todas as condições analisadas: regulação por açúcar em cana e Arabidopsis thaliana, alto brix e entrenó maduro, indicando que além de apresentar papel importante na sinalização por carboidrato, mantendo conservada sua regulação durante a evolução das angiospermas, ainda pode apresentar participação ativa em processos referentes ao acúmulo de sacarose, sendo um gene excelente candidato a estudos funcionais mais aprofundados, podendo apresentar um papel fundamental em plantas maior do que esperado. A segunda abordagem do trabalho também nos mostrou, num âmbito mais geral, genes envolvidos em cascatas de regulações do sinal sacarose em cana. A comparação entre os SAS diferencialmente expressos de cana e seus genes aparentados em Arabidospsis nos mostrou apenas 3 SAS, cujos genes ortólogos de Arabidopsis thaliana apresentam mesmo sentido de resposta, indicando aqui também uma relevante divergência entre essas espécies em termos de regulação por sacarose. Genes com regulação conservada entre cana-de-açúcar e Arabidopsis thaliana podem representar elementos fundamentais para funções básicas importantes para a sinalização. Já genes com regulação oposta podem indicar traços adaptativos de cada linhagem ao longo da evolução das angiospermas que proporcionaram vantagens seletivas para estas plantas.

Ao relacionarmos as duas abordagens e sabendo que todos os genes testados nos ensaios de qRT-PCR estavam presentes no CHIP SUCAST, percebemos que houve apenas uma sobreposição entre os experimentos de microarranjos e qRT-PCR. Apenas um SAS, representando um ABC *transporter*, apareceu nos dois experimentos. Essa ocorrência é indicativo de níveis de sensibilidade distintos apresentados pelas técnicas de qRT-PCR e microarranjos, indicando, possivelmente, uma restringência por parte desta última.

127

Este trabalho mostra uma avaliação preliminar em termos de conservação e divergência de alguns aspectos da rede de regulação ativada pelos açúcares sacarose e glicose em cana-de-açúcar e *Arabidopsis thaliana*. Dentre as perspectivas estamos propondo ampliar este estudo usando um organismo moncotiledônea modelo como o arroz para o qual podemos ter acesso ao conjunto mais amplo de genes em microaranjos. Estes estudos poderiam esclarecer como a sinalização por açúcares diversificou-se em angiospermas. De maneira mais abrangente, este tipo de estratégia pode trazer informações importantes sobre a evolução das redes de regulação que controlam a homeostase energética em plantas.

Referências Bibliográficas

Allagulova ChR., Gimalov F.R., Shakirova F.M., Vakhitov V.A. 2003. The plant dehydrins: structure and putative functions. Biochemistry (Mosc). 68:945-51.

Alms G.R., Sanz P., Carlson M. and Haystead T.A. 1999. Reg1p targets protein phosphatase 1 to dephosphorylate hexokinase II in Saccharomyces cerevisiae: characterizing the effects of a phosphatase subunit on the yeast proteome. EMBO J.18:4157-68.

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.

Alvarez-Buylla E.R., Pelaz S., Liljegren S.J., Gold S.E., Burgeff C., Ditta G.S., Ribas de Pouplana L., Martínez-Castilla L., Yanofsky M.F. 2000. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. Proc Natl Acad Sci U S A. 97:5328-33.

Ahuatzi D., Riera A., Peláez R., Herrero P. and Moreno F. 2007. Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. J Biol Chem. 282:4485-93.

Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature. 2000. 408:796-815.

Arceneaux G. 1967. Cultivated sugarcanes of the world and their botanical derivation. Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technology. 12: 844-845.

Arenas-Huertero F.; Arroyo A.; Zhou L.; Sheen J. and León 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 and Development. 14. 2085-2096.

Arnaudeau S., Frieden M., Nakamura K., Castelbou C., Michalak M., Demaurex N. 2002. Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. J Biol Chem. 277:46696-705.

Atanassova R., Leterrier M., Gaillard C., Agasse A., Sagot E., Coutos-Thévenot P., Delrot S. 2003. Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. Plant Physiol. 2003. 131:326-34.

Baena-González E., Rolland F., Thevelein J.M., Sheen J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. Nature. 488: 938-943.

Baumann O., Walz B. 2001.Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. Int Rev Cytol. 205:149-214.

Beck E.H, Fettig S., Knake C., Hartig K., Bhattarai T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. J Biosci. 32:501-10.

Bennetzen J. 2002. The rice genome. Opening the door to comparative plant biology. Science. 296:60-3.

Bläsing O.E., Gibon Y., Günther M., Höhne M., Morcuende R., Osuna D., Thimm O., Usadel B., Scheible W.R., Stitt M. 2005. Sugars and circadian regulation make majors contributions to the global regulation of diurnal gene expression in Arabidopsis. Plant Cell. 17: 3257-3281.

Blohm D.H., Guiseppi-Elie A. 2001. New developments in microarray technology. Curr Opin Biotechnol. 12:41-7.

Borisjuk N., Sitailo L., Adler K., Malysheva L., Tewes A., Borisjuk L., Manteuffel R. 1998. Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. Planta. 206:504-14.

Botha F.C., Black K.G. 2000. Surose phosphate synthase and sucrose synthase activity during maturation of internodal tissue in sugarcane. Aust J Plant Physiol. 27:81-85.

Burnquist W.L. 2000. Os arquitetos da nova cana. Revista FAPESP. 59: 3-4.

Camacho P., Lechleiter J.D. 1995. Calreticulin inhibits repetitive intracellular Ca2+ waves. Cell. 82:765-71.

Capel J., Jarillo J.A., Salinas J. and Martinez-Zapater J.M. 1997. Two homologous low-temperature-inducible genes from Arabidopsis encode highly hydrophobic proteins. Plant Physiol. 115:569-76.

Chase M.W., Fay M.F. 2001. Ancient flowering plants: DNA sequences and angiosperm classification. Genome Biol. 2: S1012.

Chen F., Hayes P.M., Mulrooney D.M., Pan A. 1994. Identification and characterization of cDNA clones encoding plant calreticulin in barley. Plant Cell. 6:835-43.

Cheng W-H., Endo A., Zhou L., Penney J., Chen H-C., Arroyo A., Leon P., Nambara E., Asami T., Seo M., Koshiba T., Sheen J. 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosyntesis and functions. Plant Cell. 14: 2723-2743.

Chiou T.J., Bush D.R. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. Proc Natl Acad Sci U S A. 95:4784-8.

Ciereszko I., Johansson H., Kleczkowski L.A. 2001. Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in Arabidopsis. Biochem J. 354:67-72.

Cho, Y.-E.; Yoo, S.-D. and Sheen J. 2006. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. Cell. 127: 579-589.

Contento A.L., Kim S.J. and Bassham D.C. 2004. Transcriptome profiling of the response of Arabidopsis suspension cells to Suc starvation. Plant Physiol. 135: 2330-2347.

Coppolino M.G., Woodside M.J., Demaurex N., Grinstein S., St-Arnaud R., Dedhar S. 1997. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. Nature. 386:843-7.

Costa M.A., Collins R.E., Anterola A.M., Cochrane F.C., Davin L.B., Lewis N.G. 2003. 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.

Danial N.N., Gramm C.F., Scorrano L., Zhang C.Y., Krauss S., Ranger A.M., Datta S.R., Greenberg M.E., Licklider L.J., Lowell B.B., Gygi S.P. and Korsmeyer SJ. 2003. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. Nature 424: 952-956.

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.

Denecke J., Carlsson L.E., Vidal S., Höglund A.S., Ek B., van Zeijl M.J, Sinjorgo K.M., Palva E.T. 1995. The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complexes in vivo. Plant Cell. 7:391-406.

Dentin R., Pégorier J.P., Benhamed F., Foufelle F., Ferré P., Fauveau V., Magnuson M.A., Girard J., Postic C. 2004. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. J. Biol. Chem. 279: 20314-20326.

Derelle E., Ferraz C., Rombauts S., Rouzé P., Worden A.Z., Robbens S., Partensky F., Degroeve S., Echeynié S., Cooke R., Saeys Y., Wuyts J., Jabbari K., Bowler C., Panaud O., Piégu B., Ball SG, Ral J.P., Bouget F.Y., Piganeau G., De Baets B, Picard A., Delseny M., Demaille J., Van de Peer Y., Moreau H. 2006. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote Ostreococcus tauri unveils many unique features. Proc Natl Acad Sci U S A. 103:11647-52.

Dijkwel P.P., Kock P., Bezemer R., Weisbeek P.J., Smeekens S. 1996. Sucrose Represses the Developmentally Controlled Transient Activation of the Plastocyanin Gene in Arabidopsis thaliana Seedlings.Plant Physiol. 110:455-463.

Donaldson J.G. 2000. Filling in the GAPs in the ADP-ribosylation factor story. Proc Natl Acad Sci U S A. 97:3792-4.

Epple P., Mack A.A., Morris V.R., Dangl J.L. 2003. Antagonistic control of oxidative stress-induced cell death in Arabidopsis by two related, plant-specific zinc finger proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 100:6831-6.

Epstein C.B., Butow R.A. 2000. Microarray technology - enhanced versatility, persistent challenge. Curr Opin Biotechnol. 11:36-41.

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 wound-inducible proteinase inhibitors. Plant Cell 4: 129-134.

Felix J.M., "Análise da envolvida expressão gênica no cana-de-acúcar (Saccharum metabolismo de sacarose em spp.)," Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2006.

Feng Q. Collaboration on the rice genome. Science. 2002. 296:45.

Fitch W.T.. 2000. The evolution of speech: a comparative . Trends Cogn Sci. 4:258-267.

Franco M, Paris S & Chabre M. 1995. The small G-protein ARF1GDP binds to the Gt beta gamma subunit of transducin, but not to Gt alpha GDP-Gt beta gamma. FEBS Lett. 362(3):286-90.

Frommer, W.B.; Schulze, W.X. and Lalonde, S. 2003. Plant science. Hexokinase, Jack-of-all-trades. Science. 300. 261-263.

Gibson S.I. 2004. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signaling network. Journal of Experimental Botany. 55: 253-264.

Giese, J.O.; Herbers, K.; Hoffmann, M.; Klösgen, R.B. and Sonnewald, U. 2005. Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from Nicotiana tabacum. FEBS Letters. 579. 827-831.

Goff SA. 2002. Collaboration on the rice genome. Science. 2002. 296:45.

Grimes H.D., Koetje DS, Fransceshi V.R. 1992. Expression, activity, and cellular accumulation of methyl jasmonate-responsive lipoxygenase in soybean seedlings. Plant Physiol. 100: 433-443.

Groenendyk J., Michalak M. 2005. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. Acta Biochim Pol. 52:381-95.

Guilfoyle T., Hagen G., Ulmasov T., Murfett J. 1998. How does auxin turn on genes? Plant Physiol. 118:341-7.

Guimarães C.T., Sills 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 USA. 94: 14261-6.

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.

Gupta A.K., Kaur N. 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. J Biosci. 30:761-76.

Halford N.G. and Hardie D.G. 1998. SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? Plant Mol Biol. 37:735-48.

Halford N.G., Hey S., Jhurreea D., Laurie S., McKibbin R.S., Zhang Y. and Paul M.J. 2003. Highly conserved protein kinases involved in the regulation of carbon and amino acid metabolism. J Exp Bot. 55:35-42.

Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks MM, Smeekens S. 2007. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. Plant J. 53:935-49.

Hedges SB, Blair JE, Venturi ML, Shoe JL. 2004. A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. BMC Evol Biol.28:4-2.

Heilmann I., Shin J., Huang J., Perera I.Y., Davies E. 2001. Transient dissociation of polyribosomes and concurrent recruitment of calreticulin and calmodulin transcripts in gravistimulated maize pulvini. Plant Physiol. 27:1193-203.

Henikoff S., Greene E.A., Pietrokovski S., Bork P., Attwood T.K., Hood L. 1997. Gene families: the taxonomy of protein paralogs and chimeras. Science. 278:609-14.

Ho S., Chao Y., Tong W., Yu S. 2001. Sugar coordinately and differentially regulates growth-and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. Plant Physiol. 125: 877-890.

Hong S.P., Leiper F.C., Woods A., Carling D. and Carlson M. 2003. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. Proc Natl Acad Sci U S A. 100:8839-43.

Ito S., Niwa Y., Nakamichi N., Kawamura H., Yamashino T. And Misuno T. 2008. Insight into Mssing Genetic Links Between Two Evening-Expressed Pseudo-Response Regulator Genes *TOC1* and *PRR5* in the Circadian Clock-Controlled Circuitry in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 49: 201-213.

Iwata Y., Kuriyama M., Nakakita M., Kojima H., Ohto M., Nakamura K. 1998. Characterization of a calcium-dependent protein kinase of tobacco leaves that is associated with the plasma membrane and is inducible by sucrose. Plant Cell Physiol. 1998. 39:1176-83.

Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A. Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Hugueney P., Dasilva C., Horner

D., Mica E., Jublot D., Poulain J., Bruyère C., Billault A., Segurens B., Gouyvenoux M. Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas V., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pè M.E., Valle G., Morgante M., Caboche M., Adam-Blondon A.F., Weissenbach J., Quétier F., Wincker P. French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization. 2007.

Jang, J.C. and Shen, J. 1994. Sugar sensing in higher plants. Plant Cell 6: 1665-1679.

Jaubert S., Ledger T.N., Laffaire J.B., Piotte C., Abad P., Rosso M.N. 2002. Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. Mol Biochem Parasitol. 121:205-11.

Jefferson R, Goldsbrough A, Bevan M. 1990. Transcriptional regulation of a patatin-1 gene in potato. Plant Mol Biol. 1990. 14:995-1006.

Johnston M. and Kim J.H. 2005. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast Saccharomyces cerevisae. Biochem. Soc. Trans. 33: 247-252.

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.

Kellis M., Birren B.W., Lander E.S. 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Nature. 428:617-24.

Kellogg E.A. 2001. Evolutionary history of the grasses. Plant Physiol. 125:1198-205.

Kepinski S., Leyser O. Plant development: auxin in loops. Curr Biol.15: 208-10.

Kim, M.; Lim, J.H.; Ahn, C.S.; Park, K.; Kim, G.T.; Kim, W.T. and Pai, H.S. 2006. Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in Nicotiana benthamiana. Plant Cell. 18. 2341-2355.

Koag M.C., Fenton R.D., Wilkens S., Close T.J. 2003. The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. Plant Physiol. 131:309-16.

Koda Y. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. Int Rev Cytol. 135:155-99.

Koch K.E. 1996. Carbohydrates modulate gene expression in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 47: 509-540.

Kramer E.M., Bennett M.J. 2006. Auxin transport: a field in flux. Trends Plant Sci. 11:382-6.

Lång V., Palva E.T. 1992. The expression of a rab-related gene, rab18, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Plant Mol Biol. 20:951-62.

Lawton-Rauh A. 2003. Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants. Mol Phylogenet Evol. 29:396-409.

Lee H.I., León J., Raskin I. 1995. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. Proc Natl Acad Sci U S A.92: 4076-9.

León P., Sheen J. 2003. Sugar and hormone connections. Trends Plant Sci. 8: 110-116.

Lespinet O., Wolf Y.I., Koonin E.V., Aravind L. 2002. The role of lineage-specific gene family expansion in the evolution of eukaryotes. Genome Res. 12:1048-59.

Li Y., Lee K.K., Walsh S., Smith C., Hadingham S., Sorefan K., Cawley G., Bevan M.W. 2006. Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. Genome Res. 16: 414-427.

Lingle S.E. 1997. Seasonal internode development and sugar metabolism in sugarcane. *Crop Science*. 37:1222-1227.

Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25:402-408.

Loreti E., Alpi A., Perata P. 2000. Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of alpha-amylase in barley embryos. Plant Physiol. 2000. 123:939-48.

Lueking A., Horn M., Eickhoff H., Büssow K., Lehrach H., Walter G. 1999. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. Anal Biochem. 270:103-11.

Lynch M. 2002. Genomics. Gene duplication and evolution. Science. 297:945-7.

Matsushika A., Kawamura M., Nakamura Y., Kato T., Murami M., Yamashino T., Mizuno T. 2007. Characterization of Circadian-Associated Pseudo-Response Regulators: II. The function of PRR5 and its molecular dissection in *Arabidopsis thaliana*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 71: 535-544.

Mauch-Mani. B., Slusarenko A.J. 1996. Production of Salicylic Acid Precursors Is a Major Function of Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Resistance of Arabidopsis to Peronospora parasitica. Plant Cell. 8:203-212.

Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., Harris E.H., Karpowicz S.J., Witman G.B., Terry A., Salamov A., Fritz-Laylin L.K., Maréchal-Drouard L., Marshall W.F., Qu L.H., Nelson D.R., Sanderfoot A.A., Spalding M.H., Kapitonov V.V., Ren Q., Ferris P., Lindquist E., Shapiro H, Lucas S.M., Grimwood J., Schmutz J., Cardol P, Cerutti H, Chanfreau G., Chen C.L., Cognat V., Croft M.T., Dent R., Dutcher S., Fernández E., Fukuzawa H, González-Ballester D, González-Halphen D, Hallmann A, Hanikenne M, Hippler M., Inwood W., Jabbari K., Kalanon M., Kuras R., Lefebvre P.A., Lemaire S.D., Lobanov A.V, Lohr M., Manuell A., Meier I. Mets L., Mittag M., Mittelmeier T., Moroney J.V., Moseley J., Napoli C., Nedelcu A.M., Niyogi K, Novoselov S.V., Paulsen I.T., Pazour G., Purton S., Ral J.P., Riaño-Pachón D.M., Riekhof W., Rymarquis L., Schroda M., Stern D., Umen J., Willows R., Wilson N., Zimmer S.L., Allmer J., Balk J., Bisova K., Chen C.J., Elias M., Gendler K., Hauser C., Lamb M.R., Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan J, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E., Terauchi A.M., Yang P., Ball S., Bowler C., Dieckmann C.L., Gladyshev V.N., Green P., Jorgensen R, Mayfield S, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, Dubchak I, Goodstein D, Hornick L, Huang YW, Jhaveri J, Luo Y, Martínez D, Ngau WC, Otillar B, Poliakov A, Porter A, Szajkowski L, Werner G, Zhou K, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Grossman AR. 2007. The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. Science. 318:245-50.

Mery L, Mesaeli N, Michalak M, Opas M, Lew DP, Krause KH. 1996. Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca2+ storage and decreases store-operated Ca2+ influx. J Biol Chem. 271:9332-9.

Meyerowitz E.M. 2002. Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. Science. 295:1482-5.

Michalak M., Guo L, Robertson M., Lozak M., Opas M. 2005. Calreticulin in the heart. Mol Cell Biochem. 263:137-42.

Ming R., Liu S.C., Moore P.H., Irvine J.E., Paterson A.H. 2001. QTL analysis in a complex autopolyploid: genetic control of sugar content in sugarcane. Genome research. 11:2075-2084.

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.

Moreno F., Ahuatzi D., Riera A., Palomino C.A. and Herrero P. 2005. Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. Biochem Soc Trans. 33:265-8.

Morris C.F., Anderberg R.J., Goldmark P.J., Walker-Simmons M.K. 1991. Molecular Cloning and Expression of Abscisic Acid-Responsive Genes in Embryos of Dormant Wheat Seeds. Plant Physiol. 95:814-821.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture Physiol. Plant. 15: 473-497.

Mustilli A.C., Merlot S., Vavasseur A., Fenzi F., Giraudat J. Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. Plant Cell.14:3089-99.

Nakano T., Suzuki K., Fujimura T. and Shinshi H. 2006. Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice. Plant Physiol. 140: 411-432.

Nambara E., Marion-Poll A. 2005 Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annu Rev Plant Biol. 56:165-85.

Navazio L., Miuzzo M., Royle L., Baldan B., Varotto S., Merry A.H., Harvey D.J., Dwek R.A., Rudd P.M., Mariani P. 2002. Monitoring endoplasmic reticulum-to-Golgi

traffic of a plant calreticulin by protein glycosylation analysis. Biochemistry. 41:14141-9.

Nei M & Kumar S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Nelson D.E., Glaunsinger B., Bohnert H.J. 1997. Abundant accumulation of the calcium-binding molecular chaperone calreticulin in specific floral tissues of Arabidopsis thaliana. Plant Physiol. 114:29-37.

Ohto M., Nakamura K. 1995. Sugar-Induced Increase of Calcium-Dependent Protein Kinases Associated with the Plasma Membrane in Leaf Tissues of Tobacco. Plant Physiol. 109:973-981.

Ohl S., Hedrick S.A., Chory J., Lamb C.J. 1990. Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from Arabidopsis. Plant Cell. 2:837-48.

Opas M., Szewczenko-Pawlikowski M., Jass G.K., Mesaeli N., Michalak M. 1996. Calreticulin modulates cell adhesiveness via regulation of vinculin expression. J Cell Biol. 135:1913-23.

Osuna D., Usadel B., Morcuende R., Gibon Y., Bläsing O.E., Höhne M., Günter M., Kamlage B., Trethewey R., Scheible W.R., Stitt M. 2007. Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived Arabidopsis seedlings. Plant J. 49(3):463-91.

Palenik B., Grimwood J., Aerts A., Rouzé P., Salamov A., Putnam N., Dupont C., Jorgensen R., Derelle E., Rombauts S., Zhou K., Otillar R., Merchant S.S., Podell S., Gaasterland T., Napoli C., Gendler K., Manuell A., Tai V., Vallon O., Piganeau G. Jancek S., Heijde M., Jabbari K., Bowler C., Lohr M., Robbens S., Werner G., Dubchak I., Pazour GJ., Ren Q., Paulsen I., Delwiche C., Schmutz J., Rokhsar D., Van de Peer Y., Moreau H., Grigoriev IV. 2007. The tiny eukaryote Ostreococcus provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. Proc Natl Acad Sci U S A. 104:7705-10.

Papini-Terzi F.S., Rocha F.R., Vêncio R.Z., Oliveira K.C., Felix 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.

Paul M.J. and Foyer C.H. 2001. Sink regulation of photosynthesis. J. Exp. Bot. 52: 1383-1400.

Paterson AH. 2008. Genomics of sorghum. Int J Plant Genomics. 362451.

Pennacchio L.A. Rubin E.M. 2003. Comparative genomic tools and databases: providing insights into the human genome. J Clin Invest. 111:1099-106.

Persson S., Rosenquist M., Svensson K., Galvão R., Boss W.F., Sommarin M. 2003. Phylogenetic analyses and expression studies reveal two distinct groups of calreticulin isoforms in higher plants. Plant Physiol. 133:1385-96.

Pessoa-Jr A., Roberto I.C., Menossi M., dos Santos R.R., Filho S.O., Penna T.C. 2005. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. Appl.Biochem.Biotechnol. 121-124: 59-70.

Podell S & Gribskov M. 2004. Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins. BMC Genomics. 5:37.

Polge C. and Thomas M. 2007. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? Trends Plant Sci. 12:20-8.

Poole R.L. (2007). The TAIR Database. Methods Mol Biol. 406:179-212.

Price J., Laxmi A., Martin S.K.S., Jang J-C. 2004. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. Plant Cell 16: 2128-2150.

Price S. 1965. Interespecific hybridization in sugarcane breeding. Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technology. 12: 1021-1026.

Poethig R.S. Life with 25,000 genes. 2001.Genome Res. 11:313-6.

Purcell P.C., Smith A.M., Halford N.G. 1998. Antisense expression of a sucrose nonfermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. Plant Physiol. 114:307-14.

Razal R.A., Ellis S., Singh S., Lewis N.G., Towers G.H.N. 1996. Nitrogen recycling in phenylpropanoid metabolism. Phytochemistry. 41: 31-35.

Reed J.W. 2001. Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. Trends Plant Sci. 6:420-25.

Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., Perroud P.F., Lindquist E.A., Kamisugi Y., Tanahashi T., Sakakibara K., Fujita T., Oishi K., Shin-I. T., Kuroki Y., Toyoda A., Suzuki Y., Hashimoto S., Yamaguchi K., Sugano S., Kohara Y., Fujiyama A., Anterola A., Aoki S., Ashton N., Barbazuk W.B., Barker E., Bennetzen J.L., Blankenship R., Cho S.H., Dutcher S.K., Estelle M., Fawcett J.A., Gundlach H., Hanada K., Heyl A., Hicks K.A., Hughes J., Lohr M., Mayer K., Melkozernov A., Murata T., Nelson D.R., Pils B., Prigge M., Reiss B, Renner T., Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A., Schween G, Shiu S.H., Stueber K., Theodoulou F.L., Tu H., Van de Peer Y., Verrier P.J., Waters E., Wood A., Yang L., Cove D., Cuming A.C., Hasebe M., Lucas S., Mishler B.D., Reski R. Grigoriev I.V., Quatrano R.S., Boore J.L. 2008. The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. Science. 319:64-9. Roach B.T. 1972. Nobilisation of sugarcane. Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technology. 14: 206-216.

Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK. 2003. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. J Exp Bot. 54:513-24.

Rolland F., Moore B., Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. Plant Cell. Supplement: 185-205.

Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annu Rev Plant Biol. 57: 675-709.

Rook F.; Corke F.; Card R.; Munz G.; Smith C. and Bevan M.W. 2001. Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. Plant J. 26: 421-433.

Rook F, Bevan MW. 2003. Genetic approaches to understanding sugar-response pathways.J Exp Bot. 54:495-501.

Rook F., Hadingham S.A., Li Y., Bevan M. 2006. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. Plant Cell Environ. 29: 426-434.

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. Europ J of Plant Phys. 113: 175-179.

Rylott E.L., Gilday A.D., Graham I.A. 2003. The gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in Arabidopsis is essential for seedling establishment. Plant Physiol. 131: 1834-1842.

Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 4:406-25.

Salmon J., Ramos J., Callis J. 2008. Degradation of the auxin response factor ARF1. Plant J. 2008. 54:118-28.

Sarma N.J., Haley T.M., Barbara K.E., Buford T.D., Willis K.A., Santangelo G.M. 2007. Glucose-responsive regulators of gene expression in Saccharomyces cerevisiae function at the nuclear periphery via a reverse recruitment mechanism. Genetics. 175:1127-35.

Sasaki T. 2002. Collaboration on the rice genome. Science. 2002. 296:45.

Schaffer R, Landgraf J, Pérez-Amador M, Wisman E. 2000. Monitoring genome-wide expression in plants. Curr Opin Biotechnol. 2:162-67.

Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown .PO. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science. 270: 467-70.

Schena M., Heller R.A., Theriault T.P., Konrad K., Lachenmeier E., Davis R.W. 1998. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. Trends Biotechnol.16:301-06. Sieciechowicz K.A., Joy K.W. and Ireland R.J. (1998). The metabolism of asparagine in plants. Phytochemistry. 27: 663-671.

Siedow J.N. 1991. Plant lypoxigenases: structure and function. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio. 42: 145-188.

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.

Sinha A.K., Hofmann M.G., Römer U., Köckenberger W., Elling L., Roitsch T. 2002. Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. Plant Physiol. 128:1480-9.

Somerville C., Somerville S. 1999. Plant functional genomics. Science. 285:380-3. .

Souza G.M., Simões A.C.Q., OliveiraK.C., Garay H.M., FioriniL.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.

Souza G.M., Papini-Terzi F.S., Rocha F.R., Waclawovsky A.J., Vencio R.Z.N., Marques J.O., Felix J.M., Menossi M., Buckeridge M., Souza A.P., Ulian E.C. Genes associated to sucrose content. Patent Application Publication US 2007/0292874, 2007.

Stitt and Krapp. 1999. The molecular physiological basis for the interaction between elevated C dioxide and nutrients. Plant Cell Environ. 22: 583-622.

Stulke J. and Hillen W. 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 2: 195-201.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol. 24:1596-9.

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.

Taniguchi M., Miura K., Iwao H., Yamanaka S. 2001. Quantitative assessment of DNA microarrays--comparison with Northern blot analyses. Genomics 71:34-9.

Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ. 1997. A genomic perspective on protein families. Science. 278:631-7.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-80.

Thimm O., Bläsing O., Gibon Y., Nagel A., Meyer S., Krüger P., Selbig J., Müller L.A., Rhee S.Y., Stitt M. 2004. MapMan: a use-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological process. Plant J. 37: 914-939.

Thornton JW, DeSalle R. 2000. Gene family evolution and homology: genomics meets phylogenetics. Annu Rev Genomics Hum Genet. 1:41-73.

Thum K.E., Shin M.J., Palenchar P.M., Kouranov A., Coruzzi G.M. Genome wide investigation of light and C signaling interactions in Arabidopsis. Genome Biol. 5: R10.

Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford NG, Geigenberger P. 2003. Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. Plant J. 35:490-500.

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. 697:42-54.

Travis, A.J.; Sui, D.; Riedel, K.D.; Hofmann, N.R.; Moss, S.B.; Wilson, J.E. and Kopf, G.S. 1999. A novel NH(2)-terminal, nonhydrophobic motif targets a male germ cell-specific hexokinase to the endoplasmic reticulum and plasma membrane. J Biol Chemi. 274: 34467-34475.

Tuskan G.A., Difazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I. Hellsten U., Putnam N., Ralph ., Rombauts S., Salamov A., Schein J, Sterck L., Aerts A., Bhalerao R.R., Bhalerao R.P., Blaudez D., Boerjan W., Brun A., Brunner A., Busov V., Campbell M., Carlson J., Chalot M., Chapman J., Chen G.L., Cooper D., Coutinho P.M., Couturier J., Covert S., Cronk Q., Cunningham R., Davis J., Degroeve S., Déjardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjärvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leplé JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouzé P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D. 2006. The genome of black cottonwood, Populus trichocarpa (Torr. & Gray). Science. 313:1596-604.

Vandepoele K, Simillion C, Van de Peer Y. 2003. Evidence that rice and other cereals are ancient aneuploids. Plant Cell. 15:192-202.

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.

Vencio, RZN, Koide, T. (2005). HT self: self-self based statistical test for low-replication microarray studies DA Res. 12:211-214

Vettore A.L, da Silva F.R. KemperE.L., Arruda P. 2001. The libraries that made SUCEST. Genet Mol Biol. 24:1-7.

Vincentz M., Cara F.A., Okura V.K., da Silva F.R., Pedrosa G.L., Hemerly A.S., Capella A.N., Marins M., Ferreira P.C., França S.C., Grivet L., Vettore A.L., Kemper E.L., Burnquist W.L., Targon M.L., Siqueira W.J., Kuramae E.E., Marino C.L., Camargo L.E., Carrer H., Coutinho L.L., Furlan L.R., Lemos M.V., Nunes L.R., Gomes S.L., Santelli R.V., Goldman M.H., Bacci M. Jr, Giglioti E.A., Thiemann O.H., Silva F.H., Van Sluys M.A., Nobrega F.G., Arruda P., Menck C.F. 2004. Evaluation of monocot and eudicot divergence using the sugarcane transcriptome. Plant Physiol. 134:951-9.

Walker L., Estelle M. 1998. Molecular mechanisms of auxin action. Curr Opin Plant Biol. 1:434-9.

Wendel JF. 2000. Genome evolution in polyploids. Plant Mol Biol. 42:225-49.

Wenzler H., Mignery G., Fisher L., Park W. 1989. Sucrose-regulated expression of a chimeric potato tuber gene in leaves of transgenic tobacco plants. Plant Mol Biol. 13:347-54.

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.

Wiese A., Elzinga N., Wobbes B., Smeekens S. 2004. A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. Plant Cell. 16:1717-29.

Wikström N., Savolainen V., Chase M.W. 2001. Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. Proc Biol Sci. 268:2211-20.

Wilson J.E. 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. J. Exp. Biol. 206: 2049-2057.

Woodward A.W., Bartel B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. Ann Bot (Lond). 95:707-35.

Wolfe K.H., Gouy M., Yang Y.W., Sharp P.M., Li W.H. 1989. Date of the monocotdicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. Proc Natl Acad Sci U S A. 86:6201-5.

Xiao W., Sheen J., Jang J.C. 2000. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. Plant Mol. Biol 44: 451-461.

Yang Y.H., Dudoit S., Luu P., Lin D.M., Peng V., Ngai J., Speed T.P.2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. Nucleic Acids Res. 30, e 15.

Yanagisawa S., Yoo S.D., Sheen J. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signaling in plants. Nature. 425: 521-525.

Yokoyama R., Hirose T., Fuji N., Aspuria E.T., Kato A., UchimiyaH. 1994. T he rolC promoter of Agrobacyerium rhizogenes Ri plasmid is activeted by sucrose in transgenic tobacco plants. Mol. Genet. 244:15-22.

Yu J. 2002. Collaboration on the rice genome. Science. 2002.

Zhou L., Jang J.C., Jones T.L., Sheen J. 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. Proceedings of National Academy of Sciences of USA. 95: 10294-10299.

Zhu T. 2003. Global analysis of gene expression using GeneChip microarrays. Curr Opin Plant Biol. 6:418-25.

ANEXO
Faremos agora uma descrição para os 24 por meio da representação de 23 árvores filogenéticas, contendo as relações de ortologia entre as seguintes espécies: angiospermas eudicotiledôneas: *Arabidopsis thaliana, Populus trichocarpa, Vitis vinifera* e *Glycine max*; das angiospermas monocotiledôneas: *Oryza sativa* (arroz) e *Sorghum bicolor*; a lycophyta *Selaginella moellendorffii*; a bryophyta *Physcomitrella patens* e as algas verdes *Ostreococcus lucimarinus, Ostreococcus tauri, Chlamydomonas reinhardtii, Micromonas pusilla* e *Volvox carteri*.

Como forma de identificação de genes ortólogos e genes próximo relacionados em *A.thaliana* e a regulação desses por açúcar, foram feitos retângulos em torno do nome desses genes. Desta forma, temos: os retângulos pontilhados indicam regulação por glicose, os retângulos com linhas contínuas indicam regulação por sacarose, retângulos verdes indicam repressão, retângulos vermelhos indicam indução e os azuis indicam genes ortólogos ou genes próximo relacionados em *Arabidopsis thaliana* que não sofrem regulação por sacarose ou glicose. Os genes de Arabidopsis não marcados indicam que os dados para eles não estavam disponíveis na literatura utilizada. Os nomes das seqüências presentes nas árvores filogenéticas correspondem a: **AT** – *Arabidopsis thaliana*; **Gm** – *Glycine max* (soybean); **jgi|Poptr1** – *Populus trichocarpa*; **F genes HVV**/ **Sim4** – *Vitis vinifera*; **LOC Os** – *Oryza sativa* (rice); **Sb** – *Sorghum bicolor* (sorghum); **jgi|Selmo1** – *Selaginella moellendorffii*; **jgi|Phypa1_1** – *Physcomitrella patens patens*; **jgi|MicpuC2** – *Micromonas pusilla CCMP1545*; **jgi|MicpuN2** – *Micromonas strain RCC299*; **jgi|Volca1** – *Volvox carteri*; **jgi|Chlre3** – *Chlamydomonas reinhardtii*.

A) SCRFLR2037F09.g - calreticulina 2



Figura 11. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCRFLR2037F09.g contra $\stackrel{0.05}{0}$ banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Os genes ortólogos deste SAS em *A. thaliana*, *AT1G56340* e *AT1G09210* são induzidos por glicose e por sacarose. O gene relacionado, *AT1G08450* é induzido por sacarose em *A. thaliana*.

B) <u>SCEQRT1024E12.g NC</u> - PAL



Figura 12. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCEQRT1024E12.g NC contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Os possíveis genes ortólogos deste SAS em *A. thaliana* são *AT3G10340, AT5G04230*, induzido e reprimido por glicose, respectivamente, e os parálogos *AT2G37040* e *AT3G53260*, induzidos por sacarose.

C) SCCCRZ1001G10.g - IAA16



Figura 13. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCRZ1001G10.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Este SAS apresenta quatro possíveis ortólogos: *AT3G04730*, *AT1G04250*, *AT3G23050* e *AT4G14550*. Apenas o primeiro é reprimido por sacarose/glicose em A. thaliana.



0.02

Figura 14. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx dos SASs SCACLR2007G02.g e SCRFLR1034G06.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Aparentemente parálogos, possuem o mesmo ortólogo em *A. thaliana*, o *AT1G78290*, também regulado negativamente por glicose e sacarose. Ainda existe um gene homólogo relacionado em *A. thaliana*, reprimido por sacarose (*AT5G66880*) e outro, *AT4G33950*, não regulado.

E) SCQGLR1085F11.g - Deidrina



Figura 15. Relações filogenéticas dos quinze primeiros hits de tblastx do SAS SCQGLR1085F11.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Possui dois ortólogos em *A. thaliana*, *AT3G50980*, reprimido por sacarose glicose e *AT5G66400*, reprimido por sacarose.

F) SCBGLR1023D05.g C - proteína LSD1



Figura 16. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCBGLR1023D05.g C contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Apresenta ortólogo único em *A. thaliana*, *AT1G32540*, reprimido por sacarose/glicose. O homólogo *AT4G20380* não é regulado por esses açúcares em *A. thaliana*.

G) SCCCRT1001E01.g - Lipoxigenase



Figura 17. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCRT1001E01.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Apresenta dois ortólogos em *A. thaliana*, *AT1G55020*, induzido por sacarose e glicose e *AT3G22400*, não regulado por sacarose/glicose.

H) SCJFRZ2032G01.g - proteína quinase caneSnRK1-2



Figura 18. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCJFRZ2032G01.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS possui ortólogo único em *A. thaliana*, *AT3G01090*, reprimido por glicose. Um gene próximo relacionado, *AT3G29160*, não é regulado por nenhum desses dois açucares.

I) SCMCRT2103B04.g - quinase caneCIPK-21



Figura 19. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCMCRT2103B04.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Apresenta dois ortólogos em *A. thaliana, AT4G14580*, e *AT3G23000*. O primeiro é induzido por sacarose e o segundo é induzido por sacarose e glicose. Outro gene relacionado, *AT5G45820*, é reprimido por estes dois açúcares. Já os genes, *AT5G01810*, *AT5G10930*, *AT1G29230* e *AT4G18700* não são regulados.

J) SCCCAM1001A03.g - ABC transporter



Figura 20. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCAM1001A03.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS possui ortólogo único em *A. thaliana*, o *AT3G28860*, que não é regulado por sacarose/glicose. Um gene próximo, em um clado irmão, o *AT2G36910* é induzido por sacarose em *A. thaliana*, já os outros genes próximos relacionados: *AT1G27940* e AT1G28010 não apresentam dados na literatura.

K) SCCCLR1C05B07.g - proteína quinase caneCIPK-3



Figura 21. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1C05B07.g contra o banco de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Pertence provavelmente a um grupo Monocotiledônea-específico. Os genes mais relacionados em *A. thaliana* seriam *AT5G21326* e *AT2G26980*, não regulados por sacarose/glicose. Um outro gene relacionado, o *AT1G01140* é reprimido por sacarose.

L) SCJFRT1005C11.g – óxido-redutase



Figura 22. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCJFRT1005C11.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS, aparentemente, faz parte de um grupo Monocotiledônea-específico. O gene mais próximo em *A. thaliana, AT3G21420*, é induzido por sacarose. Outros genes próximos, o *AT1G78550, AT4G25300, AT1G17020, AT1G17010* e *AT3G21420* não são regulados por sacarose/glicose.

M) SCCCRZ1001H05.g – fator de transcrição HLH



Figura 23. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCRZ1001H05.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Aparentemente parece se tratar de um grupo monocot específico e os genes mais relacionados em Arabidopsis seriam: *AT3G23210* e *AT4G14410*, induzidos por glicose e outros dois genes relacionados: *AT5G54680* e *AT1G51070*, não regulados.

N) SCCCRT2001H11.g NC - pequena GTPase ARF1



Figura 24. Relações filogenéticas dos quarenta e seis primeiros hits de tblastx do SAS SCCCRT2001H11.g NC contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Temos aqui, aparentemente um grupo embriófitas específico, entretanto não conseguimos reconstruir as relações de ortologia entre o SAS e os genes de Arabidopsis. Sugere-se aqui que os cinco primeiros hits de A. thaliana pertencem ao grupo de embriófitas sugerido e que o sexto hit configure um grupo externo. Uma das prováveis razões para não conseguirmos resolver as relações de ortologia dentro deste grupo é devido à distância genética ser muito pequena entre as seqüências. Os genes mais próximos em *A. thaliana*, *AT1G10630* e *AT1G70490* são induzidos por sacarose. Outros genes relacionados, *AT3G62290*, *AT5G14670* e *AT2G47170* não se mostram regulados.

O) SCCCLR2C01F06.g NC – estresse por injúria



Figura 25. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR2C01F06.g NC contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Temos aqui claramente dois grupos distintos, um de monocotiledôneas e outro de eudicotiledônea. Sugere-se aqui que seja um grupo de ortólogos e que os prováveis ortólogos em Arabidopsis do SAS em questão sejam *AT4G10270*, induzido por glicose e *AT4G10265* não regulado por esses açúcares. Nossa análise não mostra com clareza as relações de ortologia em virtude, provavelmente, de termos escolhido apenas 40 hits para comparação.

P) SCCCLR2003E10.g – fator de transcrição NAC



Figura 26. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR2003E10.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Aqui também as relações de ortologia entre o SAS em questão e os genes de Arabidopsis não estão bem claras. Os genes mais proximamente relacionados *AT5G08790*, *AT1G77540*, *AT1G01720*, *AT5G63790*, *AT3G15500*, *AT1G52890* e *AT4G27410* não são regulados por sacarose. Apenas AT3G15500 mostra-se reprimido por glicose em *A. thaliana*.

Q) SCEZHR1088E02.g – tirosina fosfatase



Figura 27. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCEZHR1088E02.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Aparentemente, *A. thaliana* perdeu o(s) gene(s) do grupo de ortólogos onde está. Os mais relacionados seriam *AT3G06110* e *AT3G23610* que não são regulados por sacarose/glicose.

R) SCEPRZ1009C10.g - proteína quinase caneOSA PK-1



Figura 28. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCEPRZ1009C10.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Pertence provavelmente a um grupo Monocotiledônea-específico, os genes mais relacionados em *A. thaliana* são: *AT1G10940*, *AT1G60940*, *AT5G08590* e *AT5G63650*. Nenhum dele é regulado por sacarose/glicose.

S) SCAGLR1021G10.g - fator de transcrição KNOTTED1



Figura 29. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCAGLR1021G10.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS apresenta ortólogo único em *A. thaliana (AT4G08150)* não regulado por sacarose/glicose. Seu homólogo *AT1G23380* também não é regulado.

T) SCBFSB1046D04.g - proteína quinase caneCIPK-16



Figura 30. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS <u>SCBFSB1046D04.g</u> contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Temos aqui claramente dois grupos distintos, um de mono e outro de eudicotiledôneas. A reconstrução das relações de ortologia entre o SAS em questão e os genes de Arabidopsis não mostra tanta clareza, possivelmente, em decorrência de nossa análise abranger apenas os quarenta primeitos hits de tblastx, contudo, sugere-se como possíveis ortólogos em *A. thaliana* os genes *AT5G07070, AT5G58380* e *AT5G01810*, nenhum regulado por sacarose/glicose.



Figura 31. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1024E11.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Possui ortólogo único em *A. thaliana* (AT1G08830) não regulado por sacarose/glicose. Outros genes relacionados, *AT2G28190*, *AT5G18100* e *AT1G08830* não são regulados.

V) SCEPRZ1010E06.g - proteína serina/treonina fosfatase (PP2C-like)



Figura 32. Relações filogenéticas dos trinta e sete primeiros hits de tblastx do SAS SCEPRZ1010E06.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Possui dois ortólogos, *AT1G17550* e *AT1G72770* não regulados por sacarose/glicose. Contudo, dois genes relacionados, *AT4G26080* e *AT5G57050* se mostram induzidos por glicose.

W) SCJLHR1028C12.g - histona H4



0.002

Figura 33. Relações filogenéticas dos quarenta e um primeiros hits de tblastx do SAS SCJLHR1028C12.g contra o banco de proteínas de genoma completo de plantas. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Constitui um grupo de ortólogos em Viridiplantae. Podemos notar a pequena distância genética entre as seqüências de histonas dos organismos apresentados. Já a distância genética entre o SAS e Sorgo pode ser devido a erro de montagem do EST. O possível ortólogo em *A. thaliana*, *ATIG07660*, não é regulado por sacarose/glicose.





Figura 38. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCACLR2029F03.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS é reprimido por sacarose. O gene homólogo relacionado de Arabidopsis *AT2G03710* é induzido por sacarose, já o gene ortólogo de Arabidopsis *AT1G24260* não é regulado por sacarose ou glicose.

Y) SCMCCL6052C09.g - receptor Ser/Thr quinase



Figura 39. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCMCCL6052C09.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS em questão é reprimido por sacarose. Seu homólogo relacionado em Arabidopsis AT5G58940 é induzido por sacarose. O gene ortólogo de Arabidopsis AT2G11520 e o gene homólogo relacionado AT4G00330 não são regulados por sacarose ou glicose.



Z) SCCCCL1002D10.b – subunidade alfa/Piruvato desidrogenase

0.1

Figura 40. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCCL1002D10.b contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS é induzido por sacarose. O gene homólogo relacionado *AT1G24180* é também induzido por sacarose. O gene ortólogo de Arabidopsis *AT2G28190* e o gene hmólogo relacionado *AT1G01090* não são regulados por glicose ou sacarose.

A1) SCJFRT1059D05.g - pequena GTPase-rab



0.02

Figura 41. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCJFRT1059D05.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS em questão é induzido por sacarose. Seus homólogos relacionados *AT4G18430/AT4G18800* também são induzidos por sacarose. Já seu gene ortólogo em Arabidopsis *AT1G16920* não é regulado por sacarose ou glicose. Seus dois genes ortólogos de Arabidopsis, *AT5G60860* e *AT3G15060* não são regulados por sacarose ou glicose.

B1) SCRFLB1056F07.g - ubiquitinação



Figura 42. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCRFLB1056F07.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS é induzido por sacarose. Os genes homólogos relacionados *AT1G20140/ AT2G25700* são induzidos por sacarose. Seu gene ortólogo *AT5G42190* e um outro gene homólogo relacionado de Arabidopsis não são regulados por sacarose ou glicose.

C1) SCCCRZ3002D03.g - fator de transcrição LIM



Figura 43. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCRZ3002D03.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS é induzido por sacarose e seu gene ortólogo de Arabidopsis não é regulado por glicose ou sacarose. O gene homólogo relacionado *AT3G55770* mostra-se reprimido por sacarose em Arabidopsis. Um outro gene homólogo relacionado de Arabidopsis, *AT2G39900* não é regulado por sacarose ou glicose.





Figura 44. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCSBST3101E05.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS em questão aparece induzido por sacarose em cana-de-açúcar. Seu gene ortólogo de Arabidopsis *AT1G66810* não é regulado por sacarose ou glicose. Já o gene homólogo relacionado *AT1G32360* é reprimido por sacarose.

E1) SCCCLR1077F09.g – pseudo-response-regulator



0.05

Figura 45. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1077F09.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS em questão é reprimido por sacarose e por glicose e seu ortólogo em Arabidopsis *AT5G24470* mostra-se também reprimido por estes dois açúcares. O SAS ainda apresenta outros dois genes homólogos relacionados de *A. thaliana*, o *AT5G02810*, reprimido por glicose e sacarose e o gene *AT5G60100* não regulado por estes açúcares.

F1) SCEQRT1027E02.g - proteína quinase caneCDPK-9



Figura 46. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCEQRT1027E02.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS é induzido por sacarose e um de seus ortólogos de Arabidopsis, o gene *AT5G04870* também é induzido por este açúcar. Um outro gene ortólogo de Arabidopsis, o *AT3G10660* e um outro gene homólogo relacionado de Arabidopsis não são regulados por sacarose ou glicose.

G1) SCAGLB2046F06.g - proteína quinase caneCIPK-22



Figura 47. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCAGLB2046F06.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS, induzido por sacarose, apresenta três possíveis ortólogos de Arabidopsis, um deles o *AT5G45810* é induzido por glicose, já os outros dois, *AT1G29230* e *AT4G18700* não são regulados por glicose ou sacarose.

H1) SCBGLR1002A09.g – fator de transcrição DRE



Figura 48. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCBGLR1002A09.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS, induzido por sacarose, apresenta o gene ortólogo de Arabidopsis *AT1G36060* reprimido por sacarose e glicose. Um gene homólogo relacionado de Arabidopsis *AT1G64380* é induzido por glicose. Outros dois genes homólogos relacionados, *AT1G78080* e *AT1G22190* não são regulados por glicose e sacarose em *A. thaliana*.

II) SCQGLR2017B03.g – proteína quinase caneMAPK-18



Figura 49. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCQGLR2017B03.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Este SAS, induzido por sacarose, apresenta três possíveis genes ortólogos e Arabidopsis, um deles o *AT3G22420*, é reprimido por glicose e sacarose. Os outros dois genes ortólogos *AT3G04910* e *AT5G28080* não são regulados por glicose ou sacarose.


0.002

Figura 50. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1066D10.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS é induzido por sacarose e apresenta três genes possíveis ortólogos de Arabidopsis: os genes *AT1G10630* e *AT1G70490* são induzidos por sacarose e o gene *AT3G62290* é reprimido por este açúcar. Os genes homólogos relacionados de Arabidopsis *AT2G47170* e *AT5G14670* não são regulados por glicose ou sacarose.

K1) SCUTST3084F06.g – proteína responsiva a estresse LTI



0.05

Figura 51. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCUTST3084F06.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS é induzido por sacarose e apresenta dois genes ortólogos possíveis de Arabidopsis, um deles o *AT3G05890* é induzido por glicose, já o gene *AT3G05880* é reprimido por sacarose. Um outro gene homólogo relacionado de Arabidopsis, o *AT2G24040* não é regulado por sacarose ou glicose.

L1) SCSGLR1025H02.g – proteína desconhecida



0.05

Figura 52. Relações filogenéticas dos nove primeiros hits de tblastx do SAS SCSGLR1025H02.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Este SAS, induzido por sacarose, que corresponde a uma proteína desconhecida, parece ser exclusivo de monocotiledôneas.

M1) SCACCL6009G07.g -patogenicidade-R-gene



Figura 53. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCACCL6009G07.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS em questão, reprimido por sacarose, parece fazer parte de um grupo monocot específico. Apresenta um homólogo relacionado de Arabidopsis, o *AT3G09010*, induzido por sacarose. O outro gene homólogo relacionado *AT1G16670* não é regulado por sacarose ou glicose.



Figura 54. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCQSLR1061E06.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Este SAS, reprimido por sacarose, faz parte de um grupo moncotiledôneas específico. O gene homólogo relacionado de Arabidopsis *AT3G09010* é induzido por sacarose. Um outro gene homólogo relacionado de Arabidopsis, o *AT16670*, não é regulado por sacarose ou glicose.



O1) SCACHR1040D12.g – proteína quinase caneCIPK-15

0.05

Figura 55. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCACHR1040D12.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Este SAS, induzido por sacarose, também faz parte de um grupo monocotiledôneas específico e apresenta três genes homólogos relacionados em Arabidospsis. Um deles, o *AT5G45820*, é reprimido por glicose e sacarose em *A. thaliana*, já os outros dois genes homólogos relacionados em Arabidopsis, *AT5G01810* e *AT5G58380* não são regulados por glicose ou sacarose.





Figura 56. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCBFSB1046D04.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Este SAS, induzido por sacarose, também faz parte de um grupo monocot-específico. Apresenta 4 genes homólogos relacionados de Arabidopsis: o gene AT5G45820, é reprimido por sacarose e glicose, já os genes AT5G58380, AT5G01810 e AT4G30960 não são regulados por glicose ou sacarose.

Q1) SCBFFL4114B06.g - receptor Ser/Thr quinase



Figura 57. Relações filogenéticas dos trinta e nove primeiros hits de tblastx do SAS SCBFFL4114B06.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Este SAS faz parte de um grupo monocot-específico e é induzido por sacarose. Apresenta três genes homólogos relacionados em *A. thaliana*: um deles, o gene *AT4G22730*, é induzido por glicose. Outros dois genes homólogos de Arabidopsis, *AT2G45340* e *AT5G51560* não são regulados por sacarose ou glicose.

R1) SCCCLR1C01H09.g - proteína quinase caneMPK1-3



0.05

Figura 58. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1C01H09.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Este SAS também faz parte de um grupo monocot-específico e apresenta três genes homólogos relacionados de Arabidopsis: o gene *AT5G55090* mostra-se induzido por sacarose, já os outros dois genes, *AT4G26890* e *AT2G32510*, não são regulados por glicose ou sacarose.

<u>S1) SCQSLB1052B11.g</u> – fator de transcrição HLH



0.1

Figura 59. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCQSLB1052B11.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS em questão também compõe um grupo monocot-específico e é induzido por sacarose. Apresenta dois genes homólogos relacionados de Arabidopsis, *AT3G47620*, reprimido por sacarose e *AT1G69690*, induzido por glicose. Outros três genes homólogos relacionados de Arabidopsis *AT3G27010* e *AT1G58100* não são regulados por glicose ou sacarose.

T1) SCRLRZ3041C03.g – fator de transcrição da família MYB



0.05

Figura 60. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCRLRZ3041C03.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS em questão, incluído num grupo monocotiledônea-específico é induzido por sacarose e apresenta um gene homólogo relacionado de Arabidopsis *AT3G04030*, induzido por glicose. Ainda apresenta outro gene homólogo relacionado de Arabidopsis, *AT3G24120*, reprimido por glicose e por sacarose. Outros genes homólogos relacionados, *AT5G18240*, *AT1G69580* e *AT4G13640* não são regulados por glicose ou sacarose em *A. thaliana*.

U1) SCRUSB1062E12.g- triacilglicerol lipase



0.05

Figura 61. Relações filogenéticas dos vinte e nove primeiros hits de tblastx do SAS SCRUSB1062E12.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Este SAS faz parte de um grupo monocot-específico e é induzido por sacarose. Apresenta dois genes homólogos relacionados de Arabidopsis, *AT5G18640* e *AT5G18630*, o primeiro reprimido por sacarose e segundo reprimido por sacarose e por gicose.

V1) SCEZRZ1015D09.g – proteína quinase caneRLCK



0.05

Figura 62. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCEZRZ1015D09.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS em questão é induzido por sacarose. As relações de ortologia entre os grupos não estão bem claras aqui. Contudo encontramos os genes homólogos relacionados de Arabidopsis AT205940 e AT2G26290, induzidos por sacarose e o gene AT5G01020, reprimido por este açúcar. Ainda temos os genes homólogos relacionados de Arabidopsis, AT5G35580 e AT1G61590 não regulados por glicose ou sacarose.

W1) SCBFSB1048C08.g - receptor Ser/Thr quinase



Figura 63. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCBFSB1048C08.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS em questão é monocotiledônea específico e não possui nenhum gene de Arabidopsis relacionado.

X1) SCEPRZ1008A04.g - fator de transcrição EREBP



Figura 64. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCEPRZ1008A04.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS pertence a um grupo monocotiledôneas específico e é induzido por sacarose. O gene homólogo mais próximo relacionado é *AT3G16770*, não regulado por sacarose ou glicose.

Y1) SCCCLR1072F12.g - proteína quinase canePK-BI3



Figura 65. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1072F12.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Temos aqui um grupo de ortólogos de mono e eudicotiledôneas. O SAS em questão, induzido por sacarose, apresenta os dois genes ortólogos de Arabidopsis, *AT2G24360* e *AT4G31170*, não regulados por sacarose ou glicose.

<u>Z1) SCCCLR1C07B07.g</u> – proteína ligante de RNA



Figura 66. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCCCLR1C07B07.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS em questão, induzido por sacarose apresenta dois genes ortólogos de Arabidopsis, *AT2G21660* e *AT4G39260* não regulados por sacarose ou glicose.

A3) SCCCRZ2001A10.g - inositol quinase



Figura 67. Relações filogenéticas dos trinta e sete primeiros hits de tblastx do SAS SCCCRZ2001A10.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS, reprimido por sacarose, apresenta dois genes ortólogos de Arabidopsis AT5G64070 e AT5G09350, não regulados por sacarose ou glicose. Já o gene homólogo relacionado, AT1G49340 e AT1G51040 também não regulados por estes açúcares.





0.05

Figura 68. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCJFSB1010G10.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS, induzido por sacarose, apresenta o gene ortólogo de Arabidopsis, *AT1G01120* e o homólogo próximo relacionado *AT1G26250* não regulados por sacarose ou glicose.



Figura 69. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCJLLR1054C03.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Este SAS, induzido por sacarose, apresenta o gene ortólogo de Arabidopsis AT5G57610 e os genes homólogos relacionado de Arabidopsis AT1G59570, AT1G16270, AT2G35050, AT3G24720, AT1G04700, AT3G46920 e AT5G57610 não regulados por sacarose ou glicose.

D3) SCSBST3096H04.g - inositol fosfatase



Figura 70. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCSBST3096H04.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS, reprimido por sacarose, apresenta os genes rtólogos de Arabidopsis ATIG34120 e ATIG71710 não regulados por sacarose ou glicose. Os genes homólogos relacionados AT2G32010, AT1G05470 e AT4G18010 não são regulados por sacarose ou glicose.

E3) SCUTLR1058C02.g - proteína desconhecida



0.05

Figura 71. Relações filogenéticas dos trinta e três primeiros hits de tblastx do SAS SCUTLR1058C02.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. Este SAS, induzido por sacarose, apresenta os genes ortólogos de Arabidopsis *AT5G55120* e *AT4G26850* não regulados por sacarose ou glicose.

F3) SCVPFL3048G05.g - proteína quinase canePK-E6



Figura 72. Relações filogenéticas dos quarenta primeiros hits de tblastx do SAS SCVPFL3048G05.g contra o banco de proteínas de plantas com genoma completo. A legenda de identificação da árvore está localizada no início do material anexo. O SAS, induzido por sacarose, apresenta o gene ortólogo de Arabidopsis *AT4G13000* não regulado por sacarose ou glicose.