

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO



## CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA SORBITOL DESIDROGENASE EM MILHO

Tese apresentada ao Instituto de Biologia, da  
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do  
título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, área  
de concentração Genética Vegetal e Melhoramento

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

SYLVIA MORAIS DE SOUZA

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Aluna: Sylvia Morais de Sousa

Orientador: José Andrés Yunes

Co-orientador: Paulo Arruda

Campinas/SP

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

<b>So85c</b>	<p>Sousa, Sylvia Morais de Caracterização do gene que codifica a enzima sorbitol desidrogenase em milho / Sylvia Morais de Sousa. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.</p> <p>Orientador: José Andrés Yunes. Co-orientador: Paulo Arruda. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Sorbitol. 2. L-Iditol 2-Desidrogenase. 3. Milho - Genética. 4. Amido. 5. Aldose reductase. I. Sousa, José Andrés. II. Arruda, Paulo. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	---

**Título em inglês:** Characterization of maize sorbitol dehydrogenase.

**Palavras-chave em inglês:** Sorbitol, L-Iditol 2-Dehydrogenase; Maize; Starch; Aldose reductase.

**Area de concentração:** Genética Vegetal e Melhoramento.

**Titulação:** Doutora em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** José Andrés Yunes, Marcelo Menossi Teixeira, Michel Georges Albert Vincentz, Newton Portilho Carneiro, Ivan de Godoy Maia.

**Data da defesa:** 17/03/2006.

## BANCA EXAMINADORA

---

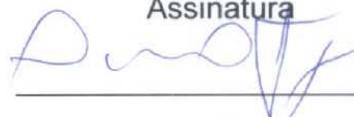
Campinas, 17 de março de 2006.

Prof. Dr. José Andrés Yunes (orientador)



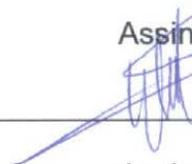
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira



Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz



Assinatura

Prof. Dr. Newton Portilho Carneiro



Assinatura

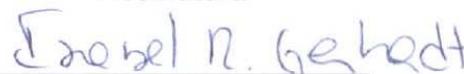
Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Azevedo Antunes

Assinatura

Profa. Dra. Isabel Gerhardt



Assinatura

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura

De tudo, ao meu amor serei atento  
Antes, e com tal zêlo, e sempre, e tanto  
Que mesmo em face do maior encanto  
Dele se encante mais meu pensamento.

Quero vivê-lo em cada vão momento  
E em seu louvor hei de espalhar meu canto  
E rir meu riso e derramar meu pranto  
Ao seu pesar ou seu contentamento.

E assim, quando mais tarde me procure  
Quem sabe a morte, angústia de quem vive  
Quem sabe a solidão, fim de quem ama

Eu possa me dizer do amor (que tive):  
Que não seja imortal, pôsto que é chama  
Mas que seja infinito enquanto dure.

*Vinícius de Moraes, Soneto da Fidelidade*

## DEDICATÓRIA

---

Aos meus pais, por todo amor e apoio.  
Ao meu vovô Edson, que estará sempre comigo.

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço:

Ao Adilson Leite (*in memoriam*), por ter acreditado em mim e por ter me iniciado neste projeto. Pelo exemplo de pesquisador e pessoa. Agradeço também a Débora, sua esposa, pela força e carinho.

Ao José Andres Yunes, meu orientador, agradeço por ter confiado em mim e no projeto, sem ao menos me conhecer. Obrigada por ter confiado em minhas idéias, muitas vezes mais do que eu mesma. Obrigada por me iniciar nos “segredos Jedis” e buscar sempre a perfeição com muita fé e bom-humor.

Ao Paulo Arruda, pelo apoio que sempre deu, por mostrar uma luz no fim do túnel, quando tudo estava difícil. Por me iniciar em projetos de educação, por mostrar como fazer pesquisa de qualidade e ser persistente (“E o paper?”).

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida durante o doutorado.

Aos membros da qualificação, Prof. Gonçalo Amarante, Prof. Antônio Figueira e Prof. Eugênio Ullian, por terem dado um rumo novo ao recém formulado projeto de doutorado.

Aos membros da pré-banca, Prof. Marcelo Menossi e Prof. Ricardo Azevedo pela atenção e idéias.

Aos membros da banca, Prof. Marcelo Menossi, Prof. Michel Vincentz, Prof. Newton Portilho e Prof. Ivan Maia, Dra. Isabel Gerhardt, Prof. Celso Benedetti e Prof. Ricardo Azevedo pela atenção.

À Dra. Karen Koch (*University of Florida*) pela busca do mutante da SDH e por todas as proveitosas discussões.

Ao Prof. Marcos Eberlin e Gustavo HMF Souza do Instituto de Química da UNICAMP pela ajuda com os experimentos de espectrometria de massas dos açúcares.

Ao Dr. Fábio C. Gozzo e Luciana do Laboratório de Espectrometria de Massas do LNLS pela ajuda com os experimentos de espectrometria de massas.

Ao Dr. Jesus Aparecido Ferro da UNESP/Jabotical e André Vettore do Instituto Ludwig pela ajuda com a biblioteca *shotgun*.

À Profa. Sandra Carmello-Guerreiro da Botânica/UNICAMP pela ajuda com os cortes histológicos. A Prof. Vera Solferini da Genética/ UNICAMP pela ajuda com os géis nativos. À Alejandra Jaramillo pela ajuda com as *in situs*. À todos os professores que contribuíram com dicas valiosas para que este trabalho fosse realizado.

Aos meus amigos Mário del Giúdice Paniago (Careca) e Eduardo Kiyota (Dudu) que enfrentaram comigo a batalha da sobrevivência na Era pós-Adilson. Obrigada por tudo, por

fazer a vida no laboratório mais divertida, pelas conversas sobre variedades e pelas idéias e ajudas nos experimentos. Sem vocês não daria para continuar.

Ao Didi, que foi meu (des) orientador durante a iniciação, que me mostrou como amar os milhos e o valor do trabalho árduo. Agradeço do fundo do coração por tudo.

Aos amigos da Era Adilson – Isa, Alba, Xilol, Branda, Tiaguinho, Ivan, Letícia, Camilla, Camila, Rodriguinho, Danizinha, Eneida, Celso, Jiri e tantos outros que deixavam o laboratório muito mais divertido e cheio de aprendizagens.

Aos meus orientados do “Ciência para Todos”: Isilda, José Carlos, Carla e Tiago e aos do Mário que foram indiretamente “explorados”: Leonardo e Aline. Aos meus orientados Aline e Diego. Muito obrigada pela ajuda e pelos ensinamentos. Tiago obrigada por sempre chegar com sua alegria contagiante. À todos os alunos do Curso de Férias e da BG581 por terem me dado a oportunidade de aprender mais.

Aos amigos do Genoma Márcio, Heidi, Fabi, Elaine, Silvia Regina e Marcelo e aos ex-genomas Almir, Ana, Gabriel e Susan pelos seqüenciamentos e galhos quebrados.

Ao Germano, por ter tornado um ano inteiro muito mais divertido (Amy!) e mais sério (cheio de discussões....). Ao Fábio Papes, Adriana Capella, Luciane Gauer, Edson Kemper, André Vettore e Felipe Rodrigues pelas conversas e conselhos e por darem o exemplo de como ser um ótimo cientista.

Ao Fisch por toda a ajuda com as seqüências, banco de dados e submissão de seqüências.

Aos amigos do laboratório do Genoma Funcional com os quais convivi bem de perto durante o doutorado Ju, Sandra, Geraldo, Jorge, Paulino, Marcelo, Layra, Michele, Agostina, Pedro, Renata, Eduardo e tantos outros que passaram por aqui. Ao Mano por ter me acolhido e por ter proporcionado tantas oportunidades de pesquisa e aprendizado. Aos amigos do laboratório do Michel, da Genética Animal, Anete, Laura e Humana por conversas agradáveis e ajudas em experimentos.

Ao Renato por ter sido minha mente bioinformática desde a época do Adilson. Por toda a ajuda em questões para mim tão nebulosas, por discussões produtivas e amizade.

Às meninas da secretaria, Tânia, Sandra, Andressa e Paula pela ajuda. Ao seu Chico por me ajudar a cuidar dos milhos e por uma conversa sempre divertida e ao Wilson pelas vidrarias. Às meninas da secretaria da pós por toda a ajuda com a papelada.

Ao Ricardo Dante, por todas idéias e contribuições dadas durante este trabalho.

À Isa por ter sido sempre atenciosa e por ter feito uma proveitosa pré-banca comigo. Agradeço também aos meus amigos Pepeu e Careca pela leitura crítica da tese.

Ao amigo BH Truman (vulgo Luiz Gustavo) por uma boa conversa no começo do turno da noite, por todas as sempre divertidas saidinhas e por ajudas e mais ajudas com as filogenias.

À minha querida amiga Thaís, por saber que posso contar sempre com ela. À Natália, pela amizade e pelas trocas de idéias. Agradeço às duas pelos almoços inesquecíveis, pelos cafés renovadores, pelo apoio nos momentos de desespero e por compartilhar a pobreza rumo a riqueza. Vou sentir saudade do nosso tempo.

Aos meus amigos da grande turma 98D, que proporcionaram grandes momentos de ceias de natal a churrascos da plebe. Ao Daniel, que durante boa parte do doutorado foi meu amigo e companheiro, pela sua ajuda em gráficos e testes de Bradford.

Às minhas queridas amigas dos times da biologia, em especial às do Hand (Plástico Bolha) e do basquete (Força Ogra). Sem meus treinos na hora do almoço e final da tarde durante estes 8 anos de UNICAMP eu não seria ninguém. Sentirei falta da energia e amizade que tive com as várias gerações.

Aos meus amigos da Galerinha 38 por toda a imensa amizade, conversas divertidas e sérias e principalmente por saber que nosso amor é eterno independentemente do tempo. Julica (*in memoriam*) agradeço por ter feito parte da minha vida. Às famílias dos meus amigos que também fizeram parte da minha vida pelo imenso carinho.

À minha amiga Lu, por ser minha irmã de coração. E a Déia por ser minha irmãzinha caçula.

Aos meus pais Artur e Simone por me amarem tanto. Quanto mais o tempo passa mais valor eu dou para tudo o que vocês me dão. Aos meus avós (Vovó Belina, que sempre esteve presente na minha vida e me deu tanto carinho, ao vovô Oswaldo e vovó Myriam, por saber que sempre estiveram torcendo por mim), aos meus tios pelo apoio e ao meu irmão Gustavo por sempre saber que está lá. À tia Renata e Cassiano por todo amor campineiro. Ao meu vovô Edson (*in memoriam*), uma das pessoas mais importantes da minha vida. Não há um só dia em que eu não pense em você para seguir a diante.

Enfim, agradeço a todos os amigos que conheci algum dia e que de alguma forma ajudaram a construir esta tese. E à UNICAMP que me criou bióloga molecular.

<b>BANCA EXAMINADORA.....</b>	<b>iii</b>
<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABREVIACÕES E TERMOS EM INGLÊS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>5</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO I - ANÁLISE DO BANCO DE ESTs DE MILHO</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
<b>2.1. A sorbitol desidrogenase é o gene com o maior número de transcritos na biblioteca de endosperma com 10 DAP.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2. A SDH não é o gene mais expresso aos 10 DAP.....</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO II - A ATIVIDADE DA SORBITOL DESIDROGENASE DE SEMENTE DE MILHO É MODULADA POR SACAROSE</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
<b>2.1. A seqüência protéica da SDH é conservada entre diferentes espécies.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2. A expressão da SDH aumenta de 10 a 15 DAP, decaindo após este período.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3. A SDH é expressa preferencialmente no endosperma do milho.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4. A SDH está localizada no endosperma amiláceo.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5. O gene SDH tem expressão aumentada em mutantes que acumulam mais sacarose.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6. A expressão e atividade da SDH repondem à sacarose.....</b>	<b>29</b>
<b>2.7. O aumento de atividade de SDH não está associado à fosforilação da enzima e parece decorrer apenas do aumento da transcrição.....</b>	<b>30</b>
<b>2.8. Seqüenciamento do clone genômico da SDH.....</b>	<b>32</b>
<b>2.9. O gene SDH tem um intron a menos em comparação com o gene SDH de arroz.....</b>	<b>34</b>
<b>2.10. A região regulatória no intron 1 controla a intensidade da expressão de SDH.....</b>	<b>38</b>
<b>2.11. A transcrição do gene SDH é ativada por sacarose e hipoxia.....</b>	<b>42</b>
<b>2.12. Possíveis elementos cis-regulatórios no intron 1 do gene SDH.....</b>	<b>45</b>

## **CAPÍTULO III - PAPEL DO SORBITOL NA SEMENTE DE MILHO - NUTRIÇÃO DO EMBRIÃO?**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>2. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
2.1. Aldose redutase – Uma alternativa para metabolização do sorbitol.....	51
2.2. Identificação de um transportador de sorbitol no endosperma de milho.....	55
2.3. O sorbitol sintetizado no endosperma é transportado para o embrião.....	56
2.4. O embrião sobrevive tendo o sorbitol como única fonte de carbono?.....	59
2.5. Qual a importância da síntese de sorbitol no endosperma para o desenvolvimento do embrião?.....	61
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>64</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>67</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	
1. Material vegetal.....	68
2. Determinação <i>in silico</i> da expressão dos genes.....	68
3. <i>Northern blot</i> .....	69
4. Análise filogenéticas.....	69
5. Atividade enzimática.....	70
6. Espectrometria de massas.....	71
7. Ensaio <i>in situ</i> de atividade enzimática.....	71
8. Método de injeção na espiga de milho.....	72
9. Isolamento do promotor.....	72
10. Biblioteca Shotgun.....	73
11. Análise computacional.....	74
12. <i>Southern blot</i> .....	74
13. Plasmídeos empregados.....	75
14. Bombardeamento.....	75
15. Análise histoquímica de GUS.....	76
16. Método de injeção do sorbitol marcado na semente de milho.....	77
17. Extração dos açúcares.....	77
18. Espectrometria de massa dos açúcares.....	77
19. Germinação dos embriões zigóticos.....	78
20. Produção e purificação da proteína AR recombinante.....	78
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

---

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática das principais partes que compõem a semente madura de milho.....	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b> Distribuição dos <i>clusters</i> com maior número de <i>reads</i> do banco de dados MAIZEST nas bibliotecas de 10, 15 e 20 DAP.....	<b>13</b>
<b>Figura 3.</b> Distribuição dos <i>clusters</i> nos bancos de dados MAIZEST, ZMDB e Genoplânt comparando as bibliotecas de endosperma, folha, raiz, pendão e plântula.....	<b>14</b>
<b>Figura 4.</b> Comparação do número de ESTs dos genes do metabolismo de amido e esquema da biossíntese de amido.....	<b>15</b>
<b>Figura 5.</b> Comparação da expressão de SDH, sacarose sintase e 27 kDa gama zeína por <i>Northern blot</i> .....	<b>17</b>
<b>Figura 6.</b> Esquema resumido da via do amido em semente de milho.....	<b>20</b>
<b>Figura 7.</b> Alinhamento entre as seqüências protéicas de SDH de <i>Zea mays</i> (milho), <i>Malus domestica</i> – maçã (Q8W2D0) e <i>Homo sapiens</i> – homem (Q00796) utilizando os programas ClustalX e BoxShade.....	<b>21</b>
<b>Figura 8.</b> Expressão da SDH em sementes de milho com 10, 15, 20 e 25 DAP.....	<b>22</b>
<b>Figura 9.</b> Atividade da SDH em sementes de milho durante diferentes períodos do dia.....	<b>23</b>
<b>Figura 10.</b> Localização da SDH em diferentes tecidos de milho.....	<b>24</b>
<b>Figura 11.</b> Tipos celulares do endosperma de milho.....	<b>25</b>
<b>Figura 12.</b> Atividade enzimática <i>in situ</i> em sementes de milho de 16 DAP.....	<b>26</b>
<b>Figura 13.</b> Expressão do transcrito da SDH nos mutantes <i>sugary1</i> e <i>shrunken2</i> .....	<b>28</b>
<b>Figura 14.</b> Expressão do gene da SDH no mutante <i>opaco2</i> .....	<b>28</b>
<b>Figura 15.</b> <i>Northern blot</i> e atividade enzimática para SDH de sementes de milho tratadas com diferentes concentrações de sacarose (0 a 300 mM).....	<b>30</b>
<b>Figura 16.</b> Atividade da SDH em sementes tratadas com diferentes concentrações de sacarose (0 a 150 mM).....	<b>31</b>
<b>Figura 17.</b> Resultado da hibridação de um dos filtros da biblioteca BAC de milho.....	<b>33</b>
<b>Figura 18.</b> <i>Southern blot</i> para confirmar os clones BAC da CUGI utilizando como sonda um fragmento do gene SDH de 1200 pb.....	<b>33</b>
<b>Figura 19.</b> <i>Southern blot</i> quantitativo para o número de cópias do que codifica a enzima sorbitol desidrogenase de milho.....	<b>34</b>
<b>Figura 20.</b> Alinhamento da região codificante de milho e arroz utilizando os programas ClustalX e Boxshade.....	<b>36</b>
<b>Figura 21.</b> Esquema da estrutura do gene da sorbitol desidrogenase de <i>Z. mays</i> (milho), <i>O. sativa</i> (arroz) e <i>A. thaliana</i> (Arabidopsis).....	<b>37</b>
<b>Figura 22.</b> Análise filogenética da proteína SDH em angiospermas.....	<b>38</b>

<b>Figura 23.</b> Resultado da comparação das seqüências de SDH de milho e arroz realizada pelo programa “Advanced Pipmaker” .....	<b>39</b>
<b>Figura 24.</b> Esquema das construções com as regiões regulatórias da SDH (à esquerda), sementes transformadas (ao meio) e coleóptiles transformados (à direita).....	<b>41</b>
<b>Figura 25.</b> Gráfico da expressão transiente em sementes e coleóptiles transformados com as construções pRT0,5GUS (0,5 Kb), pRT2,0GUS (2,0 Kb), pRT3,6GUS (3,6 Kb) e pRT35SGUS (35S).....	<b>42</b>
<b>Figura 26.</b> Atividade da enzima SDH de coleóptile de milho tratado com diferentes concentrações de sacarose (15-150 mM) e coleóptiles não tratados, como controle.....	<b>43</b>
<b>Figura 27.</b> Gráfico da expressão transiente de coleóptiles cultivados com diferentes açúcares e submetidos a hipoxia.....	<b>45</b>
<b>Figura 28.</b> Amplificação dos introns 1 e 2 de diferentes espécies de gramíneas.....	<b>46</b>
<b>Figura 29.</b> Classificação das Gramineae mostrando a relação entre os cereais cultivados e comparação do intron 1 e 2 de SDH de milho com diferentes gramíneas.....	<b>47</b>
<b>Figura 30.</b> Esquema da distribuição dos elementos regulatórios no intron 1 da SDH de milho.....	<b>48</b>
<b>Figura 31.</b> Análise de RT-PCR amplificando um fragmento relativo a AR.....	<b>52</b>
<b>Figura 32.</b> Análise filogenética da aldose redutase em diferentes espécies.....	<b>53</b>
<b>Figura 33.</b> Expressão da AR de milho em pRill com as construções pET28aNcoI $X$ hoI e pET28aNdeI $B$ amHI.....	<b>54</b>
<b>Figura 34.</b> Etapas de purificação da proteína AR nas construções pET28aNcoI $X$ hoI e pET28aNdeI $B$ amHI.....	<b>55</b>
<b>Figura 35.</b> Esquema hipotético em sementes de milho da via do sorbitol, onde a frutose é reduzida em sorbitol pela SDH, o sorbitol é translocado para o embrião pelo transportador de sorbitol e convertido em glicose pela AR.....	<b>56</b>
<b>Figura 36.</b> ESI-MS do endosperma após 6 horas da injeção na semente de milho.....	<b>57</b>
<b>Figura 37.</b> ESI-MS do embrião após 6 horas da injeção na semente de milho.....	<b>58</b>
<b>Figura 38.</b> ESI-MS do embrião (A e B) e endosperma (C e D) após 6 horas da injeção na semente de milho.....	<b>59</b>
<b>Figura 39.</b> Embriões de milho com 14 DAP crescidos com sais MS (4,5 g/l) em todos os tratamentos por 7 dias.....	<b>60</b>
<b>Figura 40.</b> <i>Screening</i> dos mutantes SDH da população <i>UniformMu</i> .....	<b>61</b>
<b>Figura 41.</b> Fenótipo da semente de milho da família <i>UniformMu</i> carregando o possível inserto Mu inserido no gene da SDH.....	<b>62</b>
<b>Figura 42.</b> Método de injeção de açúcares na espiga de milho.....	<b>72</b>
<b>Figura 43.</b> Método de injeção de $^{13}\text{C}$ sorbitol.....	<b>77</b>
<b>Tabela 1.</b> Peptídeos referentes a SDH encontrados por MS/MS.....	<b>24</b>
<b>Tabela 2.</b> Valores de Km e Vmax da atividade de SDH em sementes de milho tratadas com diferentes concentrações de sacarose obtidos pelo método de Hanes-Woolf.....	<b>31</b>
<b>Tabela 3.</b> Efeito da defosforilação na atividade de SDH utilizando fosfatase alcalina (0-5 U).....	<b>32</b>
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos <i>reads</i> seqüenciados do BAC de milho.....	<b>33</b>

**Tabela 5.** Distribuição dos ESTs da possível aldose redutase em bibliotecas de cDNA de diferentes tecidos. Número normalizado de ESTs por biblioteca (x10000).....**52**

**Tabela 6.** Distribuição do EST do possível transportador de sorbitol em bibliotecas de cDNA de diferentes tecidos. Número normalizado de ESTs por biblioteca (x10000).....**56**

## ABREVIACOES E TERMOS EM INGLES

---

<b>Contig</b>	contíguo. Sequência de DNA formada pela sobreposição de duas os mais sequências
<b>DNA</b>	cido desoxiribonucléico
<b>RNA</b>	cido ribonucléico
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>pb</b>	pares de base
<b>DO</b>	absorbância tica
<b>kb</b>	milhares de pares de base
<b>kDa</b>	kilodaltons
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction – Reação da Polimerase em Cadeia
<b>Primers</b>	seqncias iniciadoras da síntese de ácidos nucléicos
<b>Shotgun</b>	metralhadora – técnica de obtenção de fragmentos aleatórios de um inserto
<b>Read</b>	leitura - seqncia de um clone
<b>Cluster</b>	conjunto de reads que se sobrepõem
<b>Singleton</b>	read que não se sobrepõe a nenhum outro
<b>Macroarray</b>	macroarranjos
<b>GUS</b>	enzima $\beta$ -glucoronidase
<b>DTT</b>	ditiotreitol
<b>EDTA</b>	cido etilenodiaminotetracético
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDG
<b>SSC</b>	sal citrato de sódio
<b>Tris</b>	tris(hidroximetil)aminometano

A análise do banco de ESTs de endosperma de milho (MAIZEST) revelou que o gene da sorbitol desidrogenase (SDH) é o transcrito mais abundante no início do desenvolvimento da semente (aos 10 dias após a polinização - DAP). A SDH cataliza a redução NADH-dependente da frutose em sorbitol ou a oxidação do sorbitol em frutose. Em Rosaceae esta enzima tem um importante papel na translocação do sorbitol das folhas para os frutos e no armazenamento da frutose nos frutos. A semente de milho, todavia, não acumula frutose nem sorbitol, que portanto, deve ser um metabólito intermediário. A atividade bioquímica da SDH de milho já havia sido caracterizada, porém não havia informações sobre sua estrutura genômica. Visando estudar o gene da SDH, a seqüência genômica completa foi seqüenciada. A região codificante da SDH mostrou-se muito conservada, o que não ocorre com as regiões não codificantes. Inclusive, ocorrendo uma perda de introns entre as diferentes espécies de plantas. Análises de *Southern blot* e isoenzima indicaram que há apenas um *locus* de SDH em milho. As análises de *Northern blot* e atividade enzimática confirmaram que a expressão está restrita ao endosperma, e que começa logo após a polinização, atingindo o ápice aos 15 DAP e caindo a níveis baixos aos 25 DAP. A localização enzimática *in situ* mostrou que a atividade está restrita ao endosperma amiláceo, mais especificamente na região basal da semente, próxima ao embrião. Os mutantes *sugary1* e *shrunk2*, que acumulam mais açúcares, têm uma maior atividade de SDH. A injeção de até 150 mM de sacarose na semente de milho causou um aumento de atividade de SDH, confirmando os resultados obtidos com os mutantes. Esse aumento parece ser ao nível transcricional e ser regulado pelo intron 1. O intron 1 parece controlar não apenas a resposta a sacarose, mas também a resposta à hipoxia. O papel do sorbitol e da SDH nas sementes de milho em desenvolvimento parece ser crucial, porém permanece indefinido. O sorbitol é encontrado nos embriões de milho, apesar de não ter sido encontrada atividade da SDH. Além disso, foi demonstrado que os embriões conseguem se desenvolver tendo como única fonte de carbono o sorbitol. Foram encontrados ESTs no MAIZEST de um transportador de sorbitol no endosperma

e de aldose redutase (AR), capaz de converter sorbitol em glicose, no embrião. Foi mostrado também que o sorbitol pode ser transportado do endosperma para o embrião. Desta forma, podemos sugerir a partir dos resultados que o sorbitol pode ser translocado do endosperma para o embrião pelo transportador de sorbitol e ser convertido em glicose pela AR no interior do embrião. Nossos resultados indicam que o sorbitol pode atuar de três maneiras; primeiro como um açúcar que é transportado de modo não vascular do endosperma para o embrião; segundo, como um metabólito intermediário; e terceiro, servindo como um escape para o excesso de NAD(P)H formado no interior hipóxico da semente. Os resultados apresentados nesta tese mostram um mecanismo inédito de interação metabólica entre o embrião e o endosperma, mediado pelo sorbitol, cuja síntese na semente, até então, era tida como um caminho “sem saída”.

## ABSTRACT

---

At 10 DAP (days after pollinization) sorbitol dehydrogenase (SDH) was found to be the most abundant transcript, as depicted by the number of *reads* in the MAIZEST database. SDH catalyzes the NADH-dependent reduction of fructose to sorbitol or the oxidation of sorbitol to fructose. In Rosaceae, this enzyme has an important role in the sorbitol translocation from leaves to fruits and fructose storage in fruits. Maize endosperm, however, does not store fructose or sorbitol. The biochemical activity of SDH was already characterized, but there is no information about SDH genomic structure. Trying to understand better this gene we sequenced a complete genomic SDH sequence. Amino acid sequence comparisons showed SDH to be highly conserved, but the non-coding sequences were not, and an intron loss has occurred among plant species. *Southern blot* and isoenzyme analyses indicated that there is only one SDH locus in maize. *Northern blot* and enzyme activity analyses confirmed that SDH expression is restricted to the endosperm, starting early after pollinization, reaching a peak at 15 DAP and decreasing to low levels after 25 DAP. The *in situ* localization of SDH activity revealed that the enzyme is expressed all over the amilaceous endosperm, more specifically in the basal region. *Sugary1* and *Shrunken2* mutants, that store more sugar, had a higher SDH activity. Upon injection of up to 150 mM of sucrose in maize ear SDH activity increased, confirming the mutant's results. Such increase seemed to be at the transcriptional level and regulated by the first intron. The first intron seems to control not only sucrose, but also hypoxia response. The role of sorbitol in developing maize kernels is potentially pivotal, but remains undefined. Sucrose arriving at the kernel base is metabolized into fructose, which can be converted to sorbitol by SDH. This is a highly active enzyme in maize endosperm, but not in embryos. Still, there is considerable sorbitol in maize embryos. We verified that embryos could grow having only sorbitol as a carbon source. We have found sorbitol transporter ESTs in endosperm and aldose-reductase, which can convert sorbitol into glucose, ESTs in embryo. We also demonstrated that sorbitol can be transported into

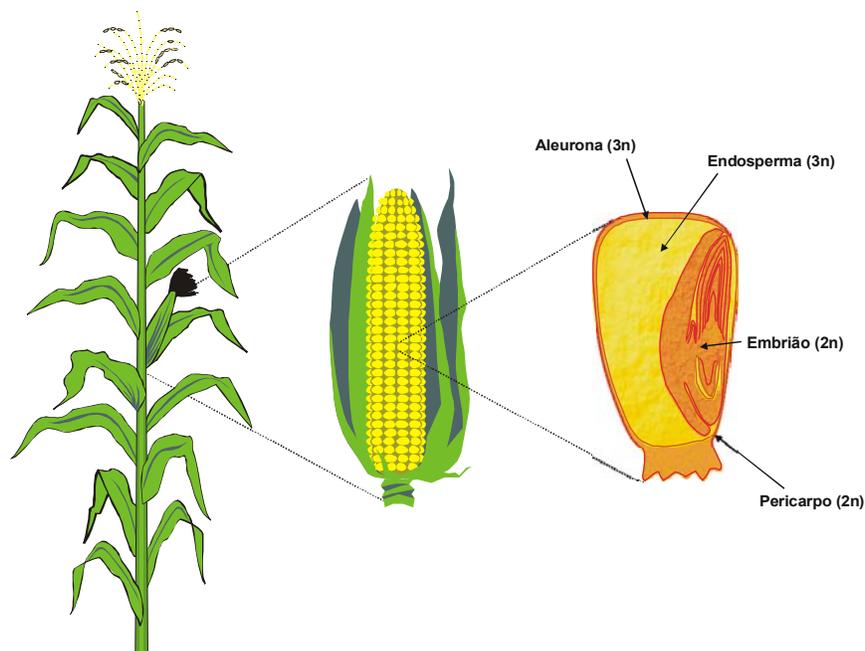
the embryo. So, we hypothesize that sorbitol can be translocated into the embryo by sorbitol transporters, and inside the embryo, AR may convert sorbitol into glucose. In summary, SDH activity and sorbitol synthesis may contribute in three critical ways during seed development; first as a non-vascular transport sugar moving from endosperm to embryo; second, as an intermediate metabolite largely isolated from sugar-signaling paths; and third, as a much-needed shuttle for excess NAD(P)H forming in the hypoxic kernel interior. The presented results showed a new mechanism of embryo-endosperm interaction, mediated by sorbitol, which was considered a dead end, until now.

## INTRODUÇÃO GERAL

---

Os cereais são as plantas cultivadas mais importantes em relação à área plantada, produção e contribuição para alimentação animal e humana. Tanto que em 2004, cerca de 680 milhões de hectares em todo mundo foram cultivados com cereais, levando à produção de mais de 2,2 bilhões de toneladas de grãos. Três culturas contribuíram com 85% deste total: arroz (605 milhões de toneladas), milho (721 milhões de toneladas) e trigo (627 milhões de toneladas) (FAO, 2004). O grande sucesso no cultivo de cereais deve-se principalmente a sua alta produtividade, facilidade de colheita e capacidade de adaptação dos cultivares a diferentes condições ambientais (revisado por Lazzeri e Shewry, 1993).

O principal produto resultante do cultivo de cereais é, sem dúvida, o grão, apesar de caules e folhas serem utilizados para silagem. Em termos botânicos, o grão é uma cariopse, tipo de fruto em que a parede da semente (testa) encontra-se fundida com a parede do fruto (pericarpo) (Lazzeri e Shewry, 1993). O milho é uma gramínea de origem centro e sul-americana, pertencente à tribo Andropogoneae, que engloba também o sorgo, o *Trypsacum* e o *Coix* (Claynton, 1973; 1983). A semente do milho é composta basicamente de duas partes: o endosperma e o embrião (Figura 1). Eles são produzidos por meio de um processo de fertilização dupla, única em plantas superiores (revisado por Russell, 1992). A fusão de um núcleo espermático com a célula-ovo origina o zigoto que resulta no embrião. Ao mesmo tempo, uma segunda célula espermática funde-se com uma célula binucleada central que resulta na origem do endosperma de natureza triploide (Russell, 1992).



**Figura 1.** Representação esquemática das principais partes que compõem a semente madura de milho.

O endosperma apresenta funções diferenciadas em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. No primeiro grupo, o endosperma possui função de armazenamento de nutrientes a serem utilizados durante a germinação da semente e no início do crescimento da nova planta. Na maioria das dicotiledôneas, o endosperma assiste à embriogênese nutrindo o embrião apenas nos estágios iniciais, sendo completamente assimilado durante o processo. Os cotilédones, folhas formadas durante a embriogênese, assumem a função de tecido de reserva de nutrientes a serem utilizados durante o processo de germinação (Lopes e Larkins, 1993).

A embriogênese do milho resulta na formação do endosperma e do embrião. Este último é formado por uma estrutura cotiledonária, pelo escutelo e pelo eixo embrionário. A formação do embrião ocorre em duas fases, a primeira é o período de morfogênese inicial, quando todos os tipos de tecidos e estruturas do embrião maduro estão sendo formados, e a segunda, na qual ocorre a elaboração e deposição de produtos de estoque (Clark e Sheridan, 1988).

No milho as paredes celulares do endosperma começam a formar-se no terceiro dia após polinização (DAP), completando-se no quinto DAP, quando o tecido torna-se

completamente celularizado e uninucleado. O período de crescimento mais intenso do endosperma ocorre de 8 a 13 DAP, com a ocorrência simultânea de divisões celulares e aumento de volume das células. Com 12 DAP, o endosperma preenche a região central da semente e neste estágio a camada externa de células, a aleurona, encontra-se completamente diferenciada. As divisões celulares cessam na região central do endosperma, e os núcleos iniciam um processo de endoreduplicação (duplicação cromossômica sem mitose) que eleva substancialmente o conteúdo de DNA. No milho, de 10 a 20 dias após a polinização (DAP), o conteúdo de DNA aumenta de 3 vezes o conteúdo do genoma haplóide para até 600 vezes.

A camada celular mais externa do endosperma, a aleurona, é conservada durante os processos de maturação e dissecação da semente. É um tecido formado por células morfológica e funcionalmente distintas das outras células do endosperma. Quando as sementes começam a germinar, estas células, estimuladas por ácido giberélico produzido pelo embrião, iniciam a produção de enzimas hidrolíticas. Estas enzimas catalisam a degradação das macromoléculas de reserva: amido, proteínas e DNA acumulados durante o desenvolvimento do endosperma.

O endosperma do milho constitui a principal fonte de nutrientes para a germinação do embrião. A maioria do carbono e nitrogênio utilizados nos estágios iniciais do desenvolvimento deriva de amido e de proteínas de reserva que são conhecidas pelo nome de zeínas. O conjunto destes produtos de reserva compõe aproximadamente 90% do peso seco do endosperma maduro. A produção e o acúmulo de zeínas e de amido inicia de 10 a 14 DAP nas células da camada sub-aleurônica. O acúmulo de proteínas e amido ocorre segundo um gradiente crescente da região externa para o interior, coincidindo com diversos eventos de diferenciação celular, provavelmente disparado por um rápido decréscimo na razão entre os reguladores hormonais citocinina e auxina (Lur e Setter, 1993). Na semente madura, o endosperma é diferenciado em dois tecidos principais: o endosperma amiláceo e a camada de aleurona. As células da região central do endosperma acumulam amido de forma abundante, e as regiões periféricas são mais ricas em proteínas de reserva. No final da maturação da semente, o endosperma amiláceo transforma-se num tecido mole e

quebradiço, enquanto que a região protéica torna-se dura e translúcida (Shewry e Casey, 1999).

As proteínas totais da semente seca de milho representam aproximadamente 10% do peso do grão, correspondendo a 20% da massa do embrião e a 8% do endosperma. As zeínas, que são as proteínas de reserva dos cereais solúveis em álcool, representam cerca de 60% das proteínas do endosperma. As zeínas estão distribuídas em quatro diferentes classes de acordo com o nível de solubilidade em álcool, sendo também transcritas por um número bem variado de genes. As alfa-zeínas são codificadas por famílias multigênicas (entre 70 e 100 genes), enquanto que as beta-, gama- e delta-zeínas são codificadas por poucos genes, geralmente um ou dois (Coleman e Larkins, 1999). A expressão dos vários genes de zeína é regulada ao nível transcricional de forma coordenada espacial e temporalmente (Shewry e Casey, 1999).

No endosperma, o amido é encontrado em duas formas: amilose e amilopectina. Na amilose predominam cadeias lineares de aproximadamente 1.000 resíduos de glicose unidos por ligações  $\alpha(1-4)$ , apresentando um baixo nível de ramificação  $\alpha(1-6)$ , de aproximadamente 1 a cada 1.000 resíduos. Já a amilopectina apresenta a mesma composição da amilose, porém apresenta um alto índice de ramificação. Cadeias de aproximadamente 20 resíduos de glicose ligados  $\alpha(1-4)$  são unidas por ligações  $\alpha(1-6)$  a outros ramos da molécula de amilopectina. As etapas requeridas para síntese de amido são relativamente simples e envolvem a participação de apenas três enzimas: ADP-glicose pirofosforilase (ADPGPPase), amido síntase (SS) e enzima ramificadora (SBE).

Tanto a amilose quanto a amilopectina são sintetizadas a partir de ADP-glicose, que por sua vez é sintetizada a partir de glucose-1-fosfato e ATP em reação catalisada pela enzima ADPGPPase. Na próxima etapa de síntese do amido, a enzima SS catalisa a formação da ligação  $\alpha(1-4)$  entre a extremidade não-redutora da cadeia pré-existente e uma molécula de ADP-glicose. Finalmente, as ramificações  $\alpha(1-6)$  são produzidas pela enzima SBE (revisado em Martin e Smith, 1995).

Conforme descrito anteriormente, o endosperma em cereais como o milho é um tecido especializado no fornecimento de nutrientes durante a germinação do embrião.

O desenvolvimento do endosperma e sua especialização dependem de muitos aspectos relativos à diferenciação celular, que ainda não foram completamente elucidados. Até o momento foram identificados apenas um número reduzido de moléculas e mecanismos envolvidos no controle de polaridade, divisão, tipo celular, endoreduplicação e acúmulo de nutrientes. O completo desenvolvimento da semente de milho parece depender de interações que ocorrem entre o endosperma e o embrião (revisado por Lopes e Larkins, 1993 e Bommert e Werr, 2001).

Há muito tempo vem sendo sugerido que a síntese das diferentes classes de proteínas de reserva, assim como das várias enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, poderiam ser um processo coordenado ao nível da regulação transcricional. Não somente a expressão dos genes de proteínas de reserva e da biossíntese de carboidratos segue um padrão semelhante durante o desenvolvimento do endosperma (Tsai *et al.*, 1970), como também a análise de diversos mutantes de milho tem mostrado que alterações na síntese das proteínas de reserva causam alterações também na expressão dos genes da biossíntese de carboidratos e vice-versa (Barbosa e Glover, 1978; Tsai *et al.*, 1978; Doehlert e Kuo, 1994; Giroux *et al.*, 1994). É importante ressaltar que estas alterações recíprocas são detectadas ao nível da transcrição gênica (Giroux *et al.*, 1994, Hunter *et al.*, 2002).

Nesta tese apresentamos um mecanismo inédito de interação metabólica entre o embrião e o endosperma, mediado pelo sorbitol. A tese será apresentada em três capítulos. O primeiro abordará a análise do banco de ESTs de milho (MAIZEST) e como se iniciou o estudo sobre a sorbitol desidrogenase (SDH). O segundo capítulo se refere à caracterização do gene da SDH e a modulação de sua expressão e o terceiro capítulo se refere à caracterização do papel exercido pela sorbitol desidrogenase e o possível papel do sorbitol na semente de milho.

## OBJETIVOS

---

O objetivo geral da tese foi compreender os mecanismos que controlam a expressão da sorbitol desidrogenase (SDH) de milho e o papel da SDH e do sorbitol na semente de milho.

O objetivo do Capítulo I foi analisar o banco de dados MAIZEST e encontrar genes pouco conhecidos no início do desenvolvimento, tecido específicos, com um grande número de transcritos e com potencial uso da região regulatória para transformação de plantas.

O objetivo do Capítulo II foi caracterizar o gene da SDH e o mecanismo de regulação transcricional implicado na sua expressão na semente de milho.

O objetivo do Capítulo III foi buscar o entendimento do papel do sorbitol e da SDH na semente de milho, bem como seus papéis no fluxo de carbono do endosperma para o embrião.

---

## ANÁLISE DO BANCO DE ESTs DE MILHO

### 1. INTRODUÇÃO

Desde que sua utilidade foi descrita pela primeira vez (Adams *et al.*, 1991), projetos genoma baseados em ESTs (*Expressed Sequence Tag*) têm se mostrado bastante valiosos. Eles consistem no seqüenciamento em massa da extremidade de clones arbitrários de uma biblioteca de cDNA. O processo não pretende descrever toda a seqüência do clone e é feita uma única vez. Desta forma, gera-se informação suficiente, na maior parte dos casos, para identificar a possível proteína codificada por um dado cDNA. Comparado com o seqüenciamento completo de um genoma, tem-se a vantagem de limitar o trabalho às regiões codificantes do genoma, que podem representar menos de 2% do genoma total no caso de eucariotos como o homem (Lander *et al.*, 2001). Além disso, as informações geradas por um projeto EST são muito valiosas na anotação de genomas completos.

Woo e colaboradores (2001) realizaram o primeiro estudo detalhado de expressão gênica em endosperma de milho utilizando ESTs. A análise demonstrou que apesar do elevado número de genes de  $\alpha$ -zeínas presente no genoma de milho, um número relativamente pequeno deles é expresso. Os autores mostraram que 16% dos transcritos presentes no endosperma de 10 a 45 DAP correspondem ao gene B1 da  $\alpha$ -zeína de 19 kDa. A estratégia utilizada pelo grupo permitiu também a identificação de três novas proteínas exclusivas do endosperma.

Uma segunda estratégia de uso de ESTs no estudo de expressão gênica em sementes consiste na utilização destes em ensaios de micro e macroarranjos. Esta técnica foi utilizada por Ruuska e colaboradores (2002) no estudo de variações da expressão gênica durante o desenvolvimento de sementes de *Arabidopsis*.

O seqüenciamento do genoma de diversas plantas de interesse está acelerando a aplicação de ferramentas de biotecnologia em larga escala na agricultura, levando a

obtenção de plantas mais adaptadas ao meio ambiente, mais produtivas e com melhor qualidade nutricional.

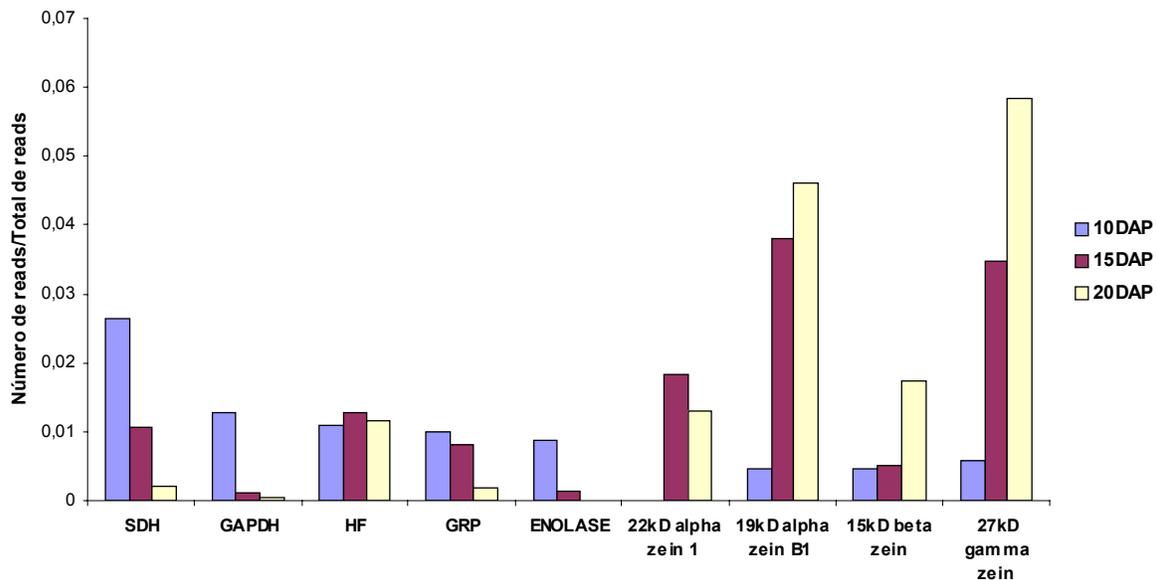
No início do projeto EST de milho, dos 103.682 ESTs de milho disponíveis no GenBank e no ZmDB (<http://www.zmdb.iastate.edu>), apenas 7999 eram provenientes de endosperma e, mesmo assim, de apenas duas bibliotecas, uma contribuindo com 7372 ESTs e a outra com 627. Neste âmbito, o projeto MAIZEST (Verza *et al.*, 2005) foi implementado no laboratório de Genômica de Plantas (CBMEG, UNICAMP) para o estudo do transcriptoma do endosperma em desenvolvimento de milho e a caracterização funcional de genes relacionados ao desenvolvimento e ao metabolismo do endosperma. O projeto baseou-se no seqüenciamento de clones de cDNA provenientes de bibliotecas de 3 fases distintas do desenvolvimento do endosperma: 10, 15 e 20 dias após a polinização.

A análise inicial do MAIZEST foi em busca de genes pouco conhecidos no início do desenvolvimento, endosperma-específicos, com um grande número de transcritos e com potencial uso da região regulatória para transformações de plantas. Foi a partir da análise apresentada neste capítulo que se iniciou o estudo sobre a sorbitol desidrogenase.

## **2. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.1. A sorbitol desidrogenase é o gene com o maior número de transcritos na biblioteca de endosperma com 10 DAP**

O banco MAIZEST ([www.maizest.unicamp.br](http://www.maizest.unicamp.br)) compreende um total de 30.531 ESTs, sendo 16.100 referentes a 10 DAP, 6.387 referentes a 15 DAP e 8.044 referentes a biblioteca de 20 DAP. Para determinar quais eram os transcritos mais abundantes em cada tempo foi feita uma análise quantitativa do número de *reads* para cada EST, nos diferentes tempos de desenvolvimento do endosperma de milho. Aos 10 DAP a sorbitol desidrogenase (SDH) foi o EST que apresentou o maior número de transcritos, pelo número de *reads* no banco de dados, seguido por gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, fator de Hageman, proteínas ricas em glicina e enolase (Figura 2).

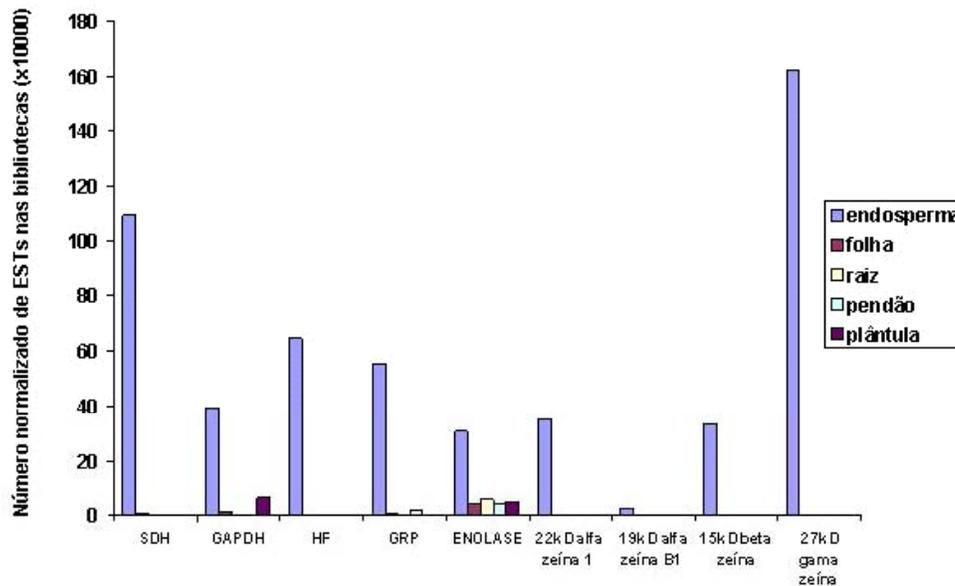


**Figura 2.** Distribuição dos *clusters* com maior número de *reads* do banco de dados MAIZEST nas bibliotecas de 10, 15 e 20 DAP. SDH (sorbitol desidrogenase), GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase), HF (Fator de Hageman), GRP (Proteínas ricas em glicina), enolase, 19-kD alfa zeína B1, 22-kD alfa zeína Z1, 15-kD beta zeína e 27-kD gama zeína.

Estes cinco ESTs mais abundantes codificam proteínas envolvidas em diferentes metabolismos da semente. A SDH é uma enzima-chave em Rosaceae, sendo a responsável pela conversão do sorbitol em frutose (Oura *et al.*, 2000). Em milho esta enzima tem função desconhecida. A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima essencial para a glicólise. Ela catalisa a conversão de gliceraldeído-3-fosfato e NAD<sup>+</sup> em 1,3 difosfoglicerato e NADH (Harris e Waters, 1976). O fator de Hageman (HF) foi descrito por Woo e colaboradores (2001) como um inibidor de protease endosperma-específico. Proteínas ricas em glicina (GRPs) foram descritas inicialmente como um tipo de proteína estrutural de parede celular. Em milho, o ácido absísico (ABA) e a dissecação induzem a GRP em embriões e folhas respectivamente. Em plantas, GRPs são normalmente representadas por pequenas famílias multigênicas (de Oliveira *et al.*, 1990). Assim como a GAPDH, a enolase também é uma enzima da glicólise, que catalisa a interconversão da 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato (Lal *et al.*, 1998). As enzimas envolvidas na glicólise são muito

ativas no início do desenvolvimento, pois este é o período de crescimento mais intenso do endosperma, quando ocorrem divisões celulares simultâneas e aumento do volume das células (Olsen, 2004).

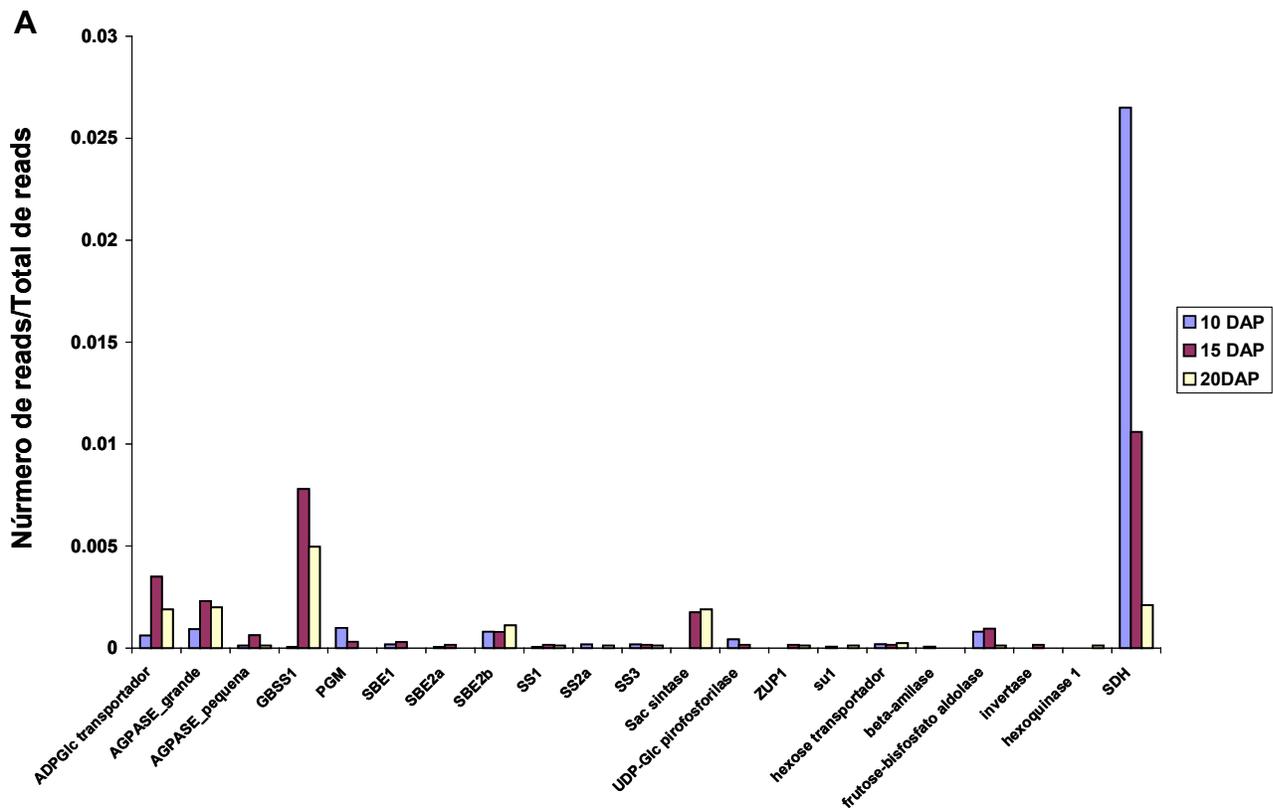
Os genes preferencialmente expressos no endosperma foram inicialmente selecionados comparando os resultados do MAIZEST com bancos públicos (ZMDB e Genoplant) com bibliotecas de diferentes tecidos (Figura 3). As zeínas, conhecidamente endosperma específicas foram usadas como controles. Dos ESTs mais abundantes analisados, apenas a SDH e o HF se mostraram preferencialmente endosperma-específicos.



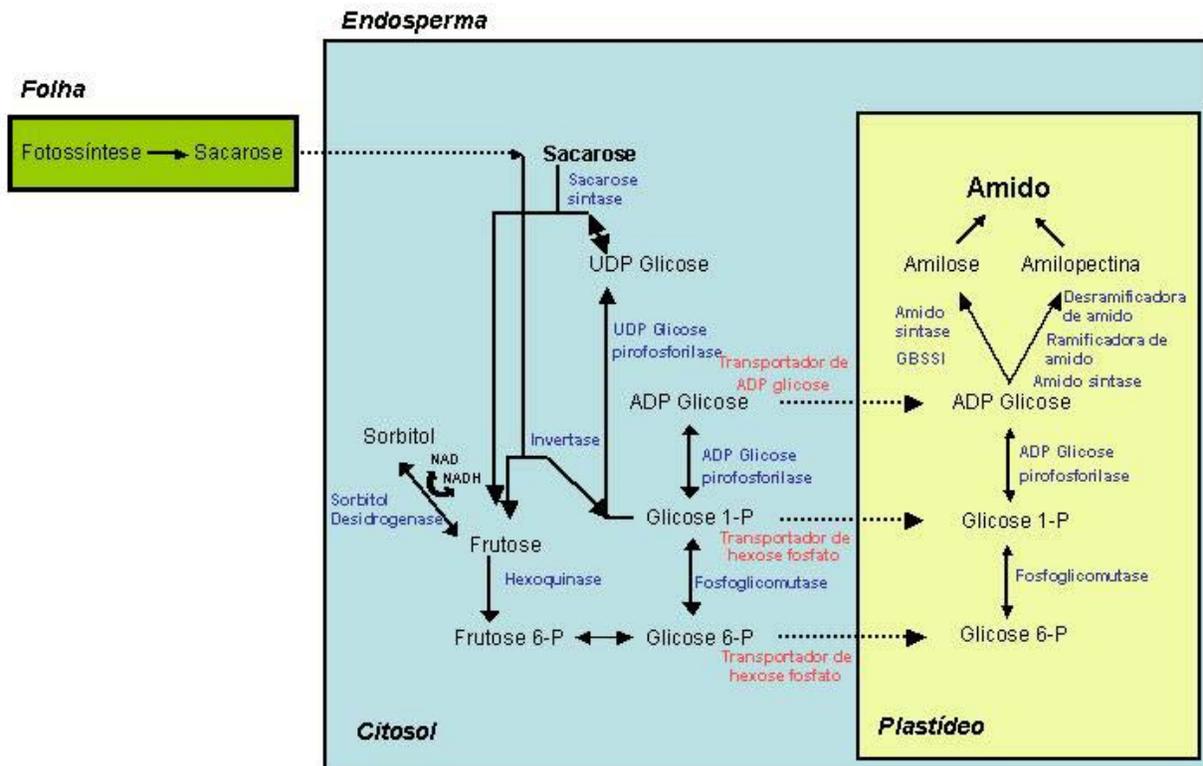
**Figura 3.** Distribuição dos *clusters* nos bancos de dados MAIZEST, ZMDB e Genoplant comparando as bibliotecas de endosperma, folha, raiz, pendão e plântula. SDH (sorbitol desidrogenase), GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase), HF (Fator de Hageman), GRP (Proteínas ricas em glicina), enolase, 19-kD alfa zeína B1, 22-kD alfa zeína Z1, 15-kD beta zeína e 27-kD gama zeína. Número normalizado de ESTs.

A partir deste resultado, decidiu-se prosseguir o trabalho de tese com o gene da SDH. Chamou a atenção o fato da expressão deste gene ser tão alta, até mesmo maior do que a expressão das zeínas (Figura 2).

Contrariamente ao esperado, a expressão da SDH parece mesmo desproporcional à expressão dos demais genes do metabolismo de açúcares para síntese de amido (Figura 4A), especialmente de considerado, que a SDH não é uma das principais enzimas da via de biossíntese de amido (Figura 4B). Portanto, ou os dados do número de *reads* não são corretos, ou a SDH poderia estar implicada em um processo diferente do da síntese de amido. A sacarose que chega a semente é clivada em glicose, UDP-glicose e frutose. A hexoquinase, que é a enzima responsável pela metabolização da frutose produzida pela sacarose sintase e invertase, apresenta um número muito baixo de ESTs quando comparado com sacarose sintase e invertase, como pode ser observado na Figura 4A. Desta forma, a SDH, que é capaz de processar a frutose, poderia ser uma alternativa para dar continuidade ao processamento da frutose que é produzida pela invertase e sacarose sintase.



B

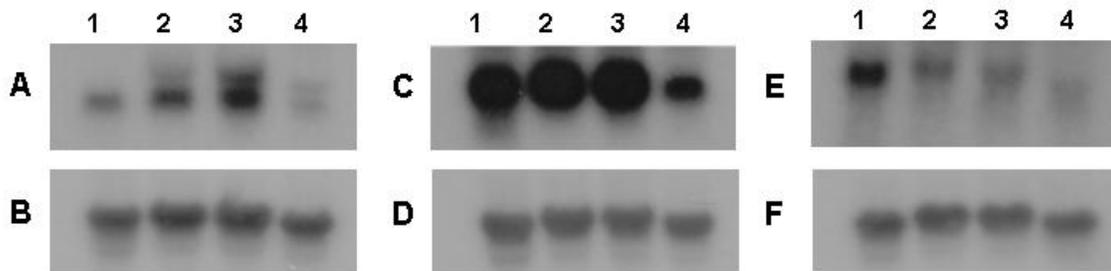


**Figura 4.** Comparação do número de ESTs dos genes do metabolismo de amido e esquema da biossíntese de amido. A: Distribuição dos *clusters* dos genes envolvidos no metabolismo de amido do banco de dados MAIZEST nas bibliotecas de 10, 15 e 20 DAP. B: Esquema simplificado da biossíntese de amido em milho. As enzimas estão em azul, os transportadores em rosa. ADPGlc transportador (ADP glicose transportador), AGPASE\_grande (ADP-glicose pirofosforilase subunidade grande), AGPASE\_pequena (ADP-glicose pirofosforilase subunidade pequena), GBSS1 (amido sintase granular1), PGM (fosfoglicomutase), SBE1 (enzima ramificadora de amido 1), SBE2a (enzima ramificadora de amido 2a), SBE2b (enzima ramificadora de amido 2b), SS1 (amido sintase 1), SS2a (amido sintase 2a), SS3 (amido sintase 3), Sac sintase (sacarose sintase), UDP-Glc pirofosforilase (UDP-glicose pirofosforilase), ZUP1 (enzima desramificadora de amido tipo pulanase), su1 (isoamilase), hexose transportador, beta-amilase, Frutose-bisfosfato aldolase, hexoquinase 1 e SDH (sorbitol desidrogenase).

## 2.2. A SDH não é o gene mais expresso aos 10 DAP.

Para confirmar se o gene da sorbitol desidrogenase é realmente tão expresso quanto indica o número de *reads* das bibliotecas de cDNA (Figura 2 e 4), foi feito *Northern blot* (Figura 5) para comparar a expressão de SDH com a de zeína de 27 kDa e a sacarose sintase. As sondas utilizadas no *Northern blot* tinham atividades equivalentes e os filmes de raio X ficaram expostos durante o mesmo período. O resultado obtido (Figura 5) mostrou que este gene é tão expresso quanto o da sacarose

sintase, porém não é tão expresso quanto a gama zeína de 27 kDa. Segundo Doehlert, 1987a, a atividade da SDH é da mesma ordem de magnitude da atividade da sacarose sintase, entre 10 e 25 DAP, o que corrobora o resultado do *Northern blot* (Figura 5). Entretanto, o perfil de expressão da SDH ao longo do desenvolvimento é diferente, sendo que, pela análise *in silico* do MAIZEST, a SDH tem um maior número de ESTs do que a zeína e a sacarose sintase, enquanto pelo *Northern blot* a zeína tem um maior número de transcritos e a sacarose sintase um número da mesma grandeza. Esta discrepância se deve ao fato de que aos 10 DAP as zeínas não são tão abundantes quanto a partir de 15 DAP, o que deve ter ocasionado uma amostragem viciada do número de seus transcritos. Além disso, no MAIZEST foram seqüenciados mais clones da biblioteca de 10 DAP (16.100) e uma quantidade menor em 15 DAP (6.387) e em 20 DAP (8.044), tornando difícil a análise comparativa da quantidade de transcritos durante o desenvolvimento. Outro fato que influenciou a análise foi o tamanho dos cDNAs considerados para se fazerem as bibliotecas. Transcritos entre 800 pb e 1.800 pb foram mais amostrados, enquanto transcritos menores e maiores foram menos amostrados. A SDH (~1.200 pb) está entre os transcritos que foram mais amostrados, enquanto a sacarose sintase, que tem um tamanho maior do que 2 kb ficou menos amostrada.



**Figura 5.** Comparação da expressão de SDH, sacarose sintase e 27 kDa gama zeína por *Northern blot*. A: *Northern blot* usando sorbitol desidrogenase como sonda, C: *Northern blot* usando gama zeína de 27 kDa como sonda, E: *Northern blot* usando sacarose sintase como sonda. B, D and F: *Northern blot* usando 26S como sonda (controle). 1- Endosperma 10 DAP, 2 - Endosperma 15 DAP, 3 - Endosperma 20 DAP e 4 - Endosperma 25 DAP.

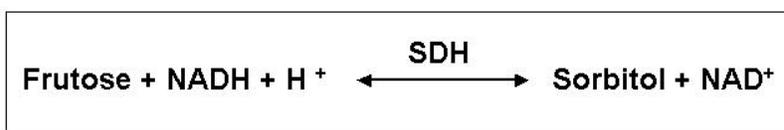
Apesar da SDH não ser tão expressa quanto inicialmente esperado, é um gene com expressão significativa e cuja função é indeterminada em milho, ao contrário dos outros 4 genes com um grande número de ESTs (Figura 2). Desta forma, prosseguiu-se com o estudo deste gene, segundo será mostrado nos capítulos subseqüentes.

---

### A ATIVIDADE DA SORBITOL DESIDROGENASE DE SEMENTE DE MILHO É MODULADA POR SACAROSE

#### 1. INTRODUÇÃO

O sorbitol é um açúcar alcoólico, amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado em animais, microorganismos e plantas (Touster e Shaw 1962; Bielecki, 1982). A sorbitol desidrogenase é capaz de reduzir frutose em sorbitol e oxidar sorbitol em frutose:



A SDH foi primeiramente purificada de fígado de rato (Blakley, 1951) e desde então já foi purificada e caracterizada em muitos organismos (Maret e Auld, 1988; Ng *et al.*, 1992; Yamaguchi *et al.*, 1994; Marini *et al.*, 1997). Nas plantas Rosaceae, o sorbitol é o principal produto fotoassimilado translocado das folhas para os tecidos de reserva, sendo responsável por 80% ou mais do carboidrato translocado no floema de maçã (Nosarszewski *et al.*, 2004 e Park *et al.*, 2002). O sorbitol translocado é convertido nas frutas destas plantas em frutose via sorbitol desidrogenase, que por isto tem um importante papel no metabolismo do carbono dos frutos em desenvolvimento (Oura *et al.*, 2000).

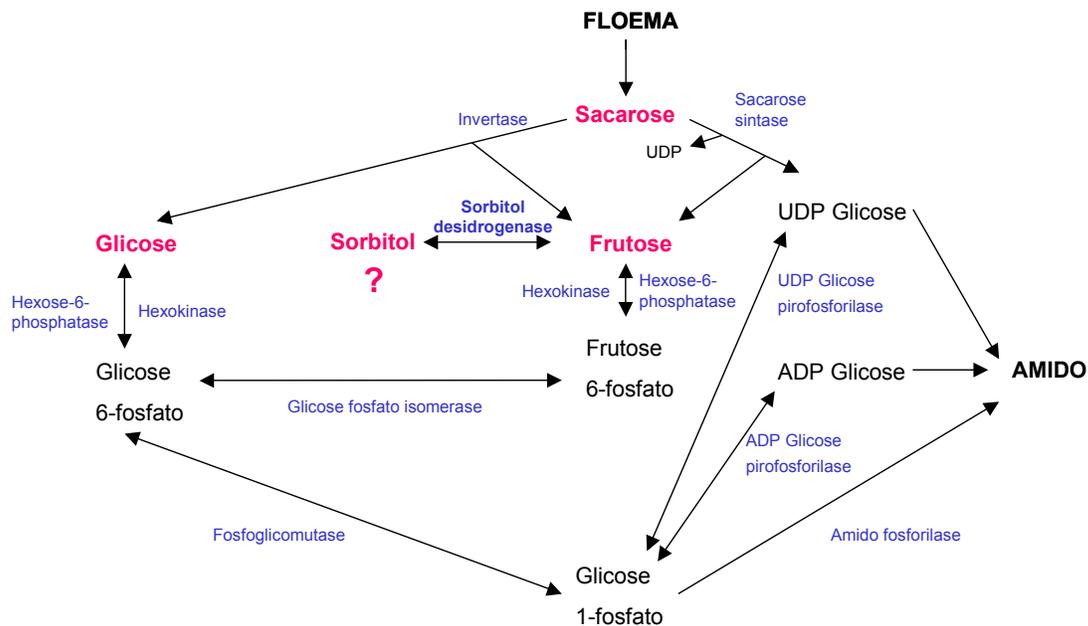
Nas sementes de milho em desenvolvimento, ao contrário das Rosaceae, o principal açúcar translocado do floema para semente é a sacarose. Existem dois mecanismos de quebra de sacarose quando esta chega do floema. Ela pode ser hidrolizada pela invertase, formando glicose e frutose, ou alternativamente, pode ser metabolizada pela sacarose sintase na presença de UDP para formar frutose e UDP-glicose (Figura 6). Em ambos os casos, a frutose é um dos produtos. Normalmente

seria de se esperar que em tecidos onde há intensa catabólise de sacarose houvesse capacidade de metabolizar frutose imediatamente, uma vez que o excesso de frutose pode inibir a a sacarose sintase (Doehlert, 1987b), sendo tóxica para a semente de milho.

Normalmente, na biossíntese de amido, a frutose produzida no endosperma é fosforilada por uma hexoquinase, enzima cuja atividade é baixa quando comparada com a atividade da sacarose sintase no endosperma de milho em desenvolvimento (Tsai *et al.*, 1970; Doehlert, 1987b), podendo limitar a utilização de sacarose neste tecido.

Procurando uma via alternativa para utilização dessa frutose, Doehlert (1987a) descobriu uma sorbitol desidrogenase de semente de milho capaz de reduzir frutose em sorbitol na presença de NADH e oxidar sorbitol em frutose na presença de NAD<sup>+</sup>. Sendo assim, a sorbitol desidrogenase apresentou-se como uma enzima capaz de dar continuidade ao fluxo de carbono na semente. Apesar de encontrarmos sorbitol no endosperma, a continuidade da via sorbitol ainda é desconhecida.

O trabalho descrito neste capítulo visou à caracterização do gene da SDH e o mecanismo de regulação transcricional implicado na sua expressão na semente de milho, lembrando que a caracterização dos mecanismos envolvidos no controle da expressão de um gene qualquer, muitas vezes ajudam a compreender a função desse gene.



**Figura 6.** Esquema resumido da via do amido em semente de milho. As enzimas da via do amido estão indicadas em azul, o floema, entrada de carbono na via, e o amido, que é o principal produto acumulado durante o processamento do carbono, estão em preto e em negrito, os produtos intermediários da via do amido estão em preto e a via hipotética do sorbitol está destacada em rosa.

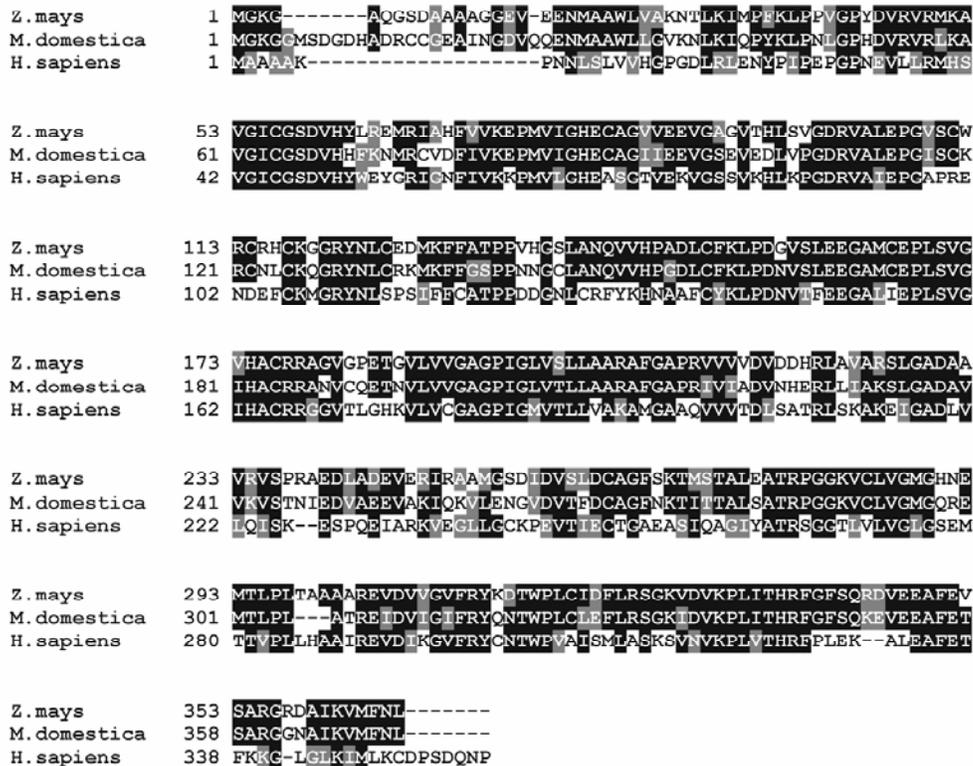
## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1. A seqüência protéica da SDH é conservada entre diferentes espécies

A sorbitol desidrogenase tem como característica fundamental um sítio de ligação a um único átomo de zinco por subunidade, o que confere a atividade catalítica do NAD-SDH, enquanto a álcool desidrogenase, por exemplo, além das diferenças estruturais, tem 2 átomos de zinco por subunidade (Luque *et al.*, 1998).

A seqüência protéica da SDH do EST de milho foi comparada com as seqüências conhecidas de maçã (*Malus domestica*) e homem (*Homo sapiens*) (Figura 7). Esta comparação mostrou que a seqüência protéica é extremamente conservada, e que a seqüência de milho contém o sítio de ligação, que confere a atividade NAD-SDH, confirmando que o EST trata-se realmente de um transcrito de SDH.

A alta similaridade entre as SDH de espécies tão distantes muito provavelmente se deve ao fato de que os domínios de ligação desta proteína estão distribuídos ao longo de toda a seqüência e não em blocos conservados.



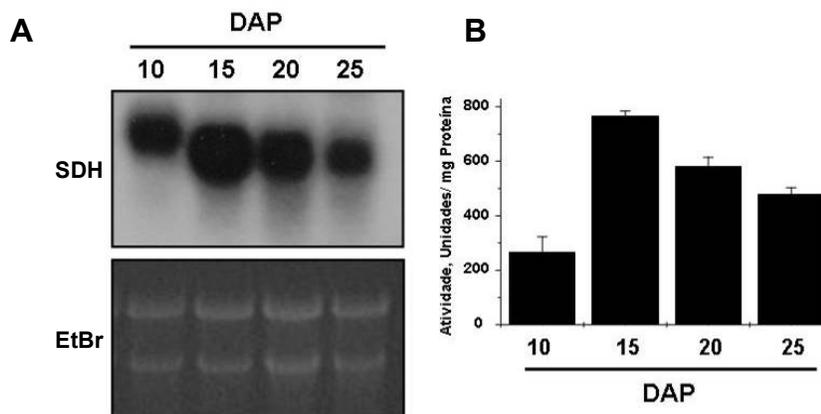
**Figura 7.** Alinhamento entre as seqüências protéicas de SDH de *Zea mays* - milho, *Malus domestica* – maçã (Q8W2D0) e *Homo sapiens* – homem (Q00796) utilizando os programas ClustalX e BoxShade. Os blocos em preto mostram a conservação dos aminoácidos e os em cinza a moderada conservação dos aminoácidos. Os traços indicam os espaços que foram introduzidos para maximizar o alinhamento.

## 2.2. A expressão da SDH aumenta de 10 a 15 DAP, decaindo após este período.

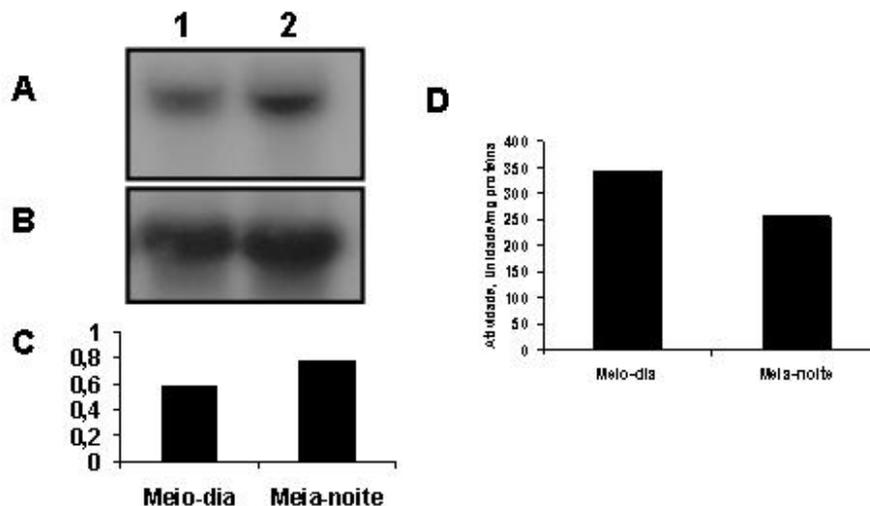
Ensaios de *Northern blot* e de atividade enzimática mostraram que tanto a expressão do gene *SDH* quanto a atividade da SDH de milho estão intensas na semente aos 10 DAP, tendo seu pico em 15 DAP e decaindo após este período (Figura 8). Segundo Doehlert *et al.*, (1994), a atividade da SDH se inicia aos 20 DAP e tem seu pico em 30 DAP, decaindo após este período. Esta diferença em relação aos nossos resultados provavelmente se deve às diferentes condições de cultivo, o que também

pode explicar a diferença encontrada entre os ensaios mostrados nas Figuras 5 e 8. O aumento da expressão da SDH coincide com o período de maior fluxo de sacarose para a semente e com o pico de síntese de amido e decai à medida que a semente começa a desidratar (Olsen, 2004), indicando que a SDH pode estar relacionada diretamente com a nutrição das células e a síntese de amido.

Por meio da quantificação de RNA e atividade enzimática de sementes colhidas em diferentes horários do dia, pode-se observar que a expressão do gene não varia entre o dia e a noite (Figura 9). Durante a noite, embora não ocorra fotossíntese, as folhas de milho reconvertem o amido armazenado durante o dia, em sacarose, que é translocada para a semente, que portanto, mantém o metabolismo dos açúcares ativo. A atividade da SDH nestes períodos tem a mesma intensidade, indicando que o sorbitol não pode ser um metabólito temporário no endosperma.



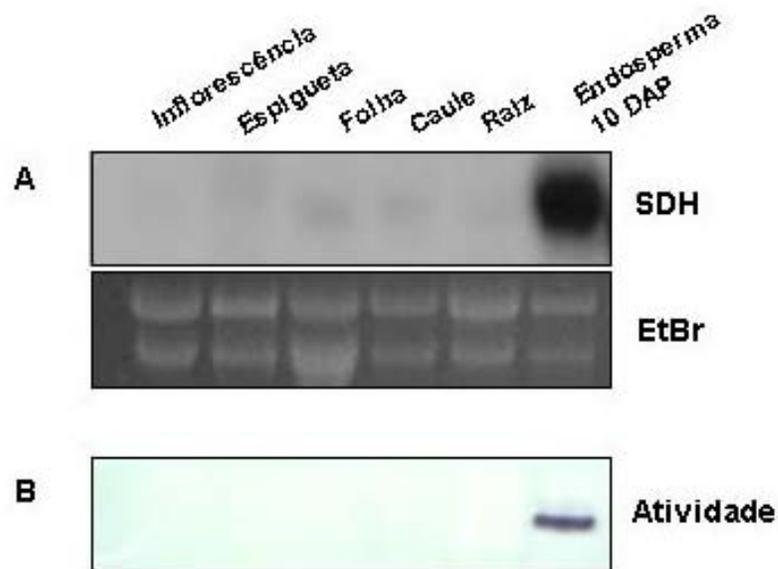
**Figura 8.** Expressão da SDH em sementes de milho com 10, 15, 20 e 25 DAP. A: *Northern blot* utilizando como sonda o gene que codifica a enzima SDH (400 pb). EtBr - Controle com RNA ribossomal corado com brometo de etídeo. Foram utilizados 12  $\mu$ g de RNA total de cada idade de desenvolvimento da semente. B: Atividade da SDH em endosperma de milho em desenvolvimento (10, 15, 20 e 25 DAP) a 30 °C, pH 9,0. Concentração de NAD 2 mM. Os valores são médias de 4 ensaios diferentes.



**Figura 9.** Atividade da SDH em sementes de milho durante diferentes períodos do dia. A: *Northern blot* usando SDH como sonda (400 pb). B: *Northern blot* usando 26S como sonda (controle). C: Expressão da SDH normalizada em função de 26S. 1 – Endosperma de milho coletado ao meio-dia, 2- Endosperma de milho coletado à meia-noite. Foram utilizados 12 µg de RNA total de semente. D: Atividade enzimática da sorbitol desidrogenase em unidade/ mg proteína.

### 2.3. A SDH é expressa preferencialmente no endosperma do milho

Para determinar em quais tecidos o gene *SDH* é expresso e confirmar a análise *in silico* (Figura 3, Capítulo I), foi feito um experimento de *Northern blot* com RNA de diversos tecidos e órgãos da planta de milho, onde confirmou-se que o gene da *SDH* é expresso predominantemente no endosperma do milho (Figura 10). Resultados iguais foram obtidos pela análise da atividade enzimática da SDH nos diferentes tecidos. Como mostra a Figura 10, a atividade da enzima, feita em gel nativo, está restrita à semente, mais especificamente ao endosperma. A banda do gel nativo correspondente ao local da atividade foi cortada e as proteínas foram eluídas, digeridas e avaliadas por espectrometria de massa para confirmar que a atividade encontrada era da SDH e não uma reação inespecífica de outra desidrogenase. Esta análise resultou em três peptídeos, todos confirmando a identidade SDH da banda visualizada no gel (Tabela 1).



**Figura 10.** Localização da SDH em diferentes tecidos de milho. A: SDH, *Northern blot* utilizando sonda de 400 pb do gene que codifica a enzima SDH. EtBr - Controle com RNA ribossomal corado com brometo de etídeo. Foram utilizadas 12 µg de RNA total de cada tecido. B: Atividade - Gel de PAGE nativo revelado com tampão de reação (68 mM sorbitol, 0,15 mM NAD, 0,18 mM nitro blue tetrazolium, 0,06 mM phenazine methasulfate e 50 mM Tris-HCl pH 9,0).

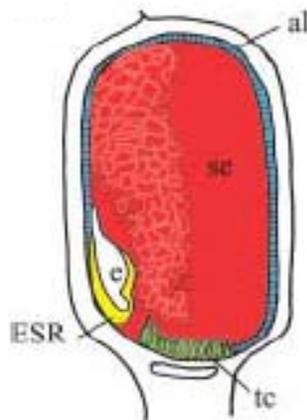
**Tabela 1.** Peptídeos referentes a SDH encontrados por MS/MS.

Início	Fim	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Seqüência
41	50	1111,644	1111,603	0,042	LPPVGPYDVR
125	132	1071,472	1071,436	0,035	YNLCEDMK
229	237	858,467	858,456	0,011	SLGADAAVR

Para verificar se o gene SDH estaria relacionado com o processo de utilização do amido da semente em germinação, foi testada a atividade enzimática da SDH em sementes de milho inteiras com 24, 48 e 72 horas após a germinação, porém não houve atividade da SDH em nenhum destes momentos. Além disso, a SDH não foi encontrada em embriões somáticos de milho, mesmo após diferentes períodos de indução e regeneração. Foi observada, entretanto, baixa atividade de SDH em embriões somáticos cultivados com sorbitol, como já havia sido descrito por Swedlund e Locy (1993).

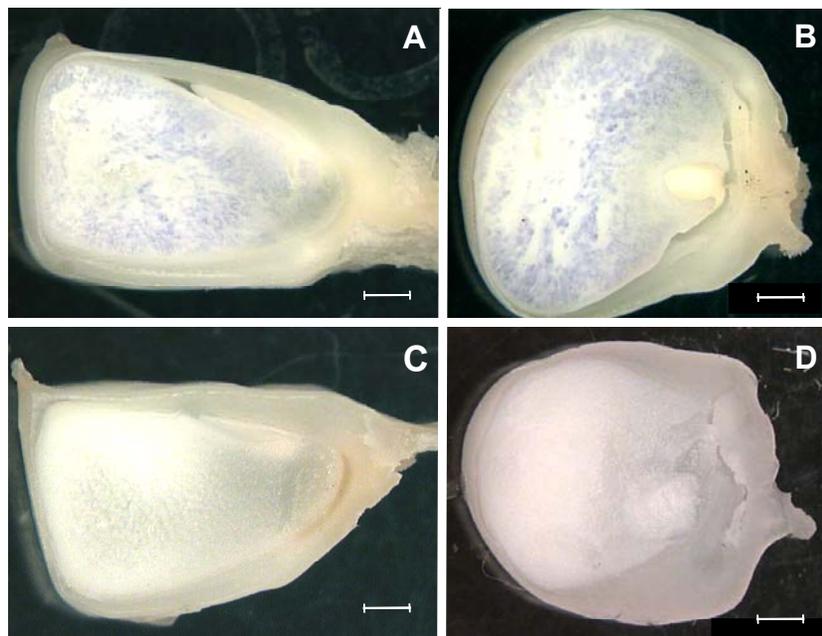
#### 2.4. A SDH está localizada no endosperma amiláceo

A semente de milho é dividida principalmente em pericarpo, nucelo, embrião, região placentó-chalazal e endosperma. O endosperma está dividido basicamente em quatro tipos celulares: o endosperma amiláceo, a camada de aleurona, as células de transferência e as células da região que circunda o embrião (Figura 11). O papel exato da região que circunda o embrião não é conhecido, mas seus possíveis papéis são: a nutrição do embrião, uma barreira física entre o embrião e o endosperma durante o desenvolvimento da semente ou uma zona de comunicação entre o embrião e o endosperma. As células de transferência se desenvolvem na parte basal do endosperma e vão até o tecido vascular materno, onde facilitam a transferência de solutos, principalmente sacarose, aminoácidos e monossacarídeos através do plasmalema entre os compartimentos simplásticos (planta materna) e apoplásticos (endosperma). O endosperma amiláceo representa a maior parte do endosperma. As células deste tecido acumulam amido e proteínas de reserva que são codificadas por transcritos diferencialmente expressos nestas células. As células da aleurona cobrem o perímetro do endosperma com exceção da região das células de transferência. A função principal desta região é mobilizar, na germinação, amido e proteínas de reserva do endosperma amiláceo através da produção de hidrolases, glucanases e proteinases depois da estimulação hormonal do embrião (Olsen, 2004).



**Figura 11.** Tipos celulares do endosperma de milho. Endosperma amiláceo (se), aleurona (al), células de transferência (tc), células que circundam o embrião (ESR). O embrião está indicado por (e). Figura retirada de Olsen, 2004.

Por meio de experimentos de atividade enzimática e *Northern blot* verificou-se que a expressão da SDH ocorre exclusivamente no endosperma (Figura 10). Para determinar qual a região específica do endosperma que expressa SDH, de maneira a correlacionar o local com uma possível função, foi feita atividade *in situ*. Descobriu-se que a SDH é expressa exclusivamente no endosperma amiláceo, predominantemente na parte basal, porém com distribuição em toda a região (Figura 12 A e B). Como controle, para detectar atividade endógena não específica, usou-se tampão de reação sem o substrato sorbitol (Figura 12 C e D). A localização da atividade SDH parece relacionada ao processamento da sacarose, nos tecidos onde ocorre a metabolização da sacarose para síntese de amido e ou nutrição celular. Não parece particulamente ligada ao processo de translocação de sacarose para dentro do endosperma, situação em que esperaríamos expressão da SDH nas regiões próximas à zona de células de transferência (Figura 11) e tampouco parece relacionada à aleurona ou ao embrião.



**Figura 12.** Atividade enzimática *in situ* em sementes de milho de 16 DAP. A e B: Sementes com tampão de reação (68 mM sorbitol, 0,15 mM NAD, 0,18 mM nitro blue tetrazolium, 0,06 mM phenazine methasulfate e 50 mM Tris-HCl, pH 9,0). C e D: Sementes com tampão de reação, sem sorbitol. A escala representa 2 mm.

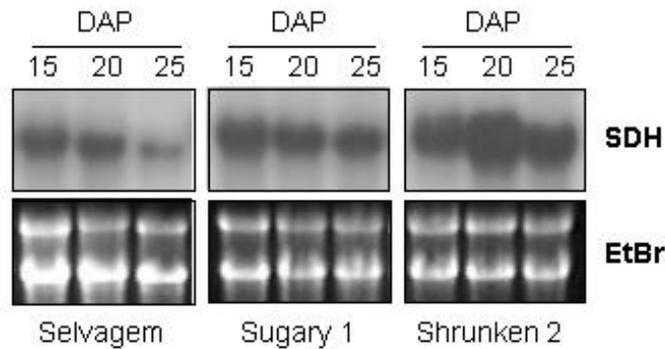
## 2.5. O gene SDH tem expressão aumentada em mutantes que acumulam mais sacarose

Historicamente, os estudos de mutantes têm permitido obter uma grande parte das informações sobre a cadeia de genes envolvidos na síntese de amido. Para verificar se a expressão do gene da *SDH* estaria relacionada ao metabolismo da sacarose, foram analisados dois mutantes da via da biossíntese de amido, *sugary1* e *shrunk2*, conhecidos por apresentarem maior acúmulo de sacarose na semente, e um mutante da via de síntese de proteína, *opaco2*, como controle. No mutante *shrunk2*, ocorrem redução de amido e aumento de açúcares, sendo as principais enzimas afetadas a ADPG-pirofosforilase, que diminui, e a hexoquinase, que aumenta a expressão. No mutante *sugary1*, ocorre redução de amido e aumento de açúcares e fitoglicogênio, sendo afetadas a enzima desramificadora, que diminui a expressão, e a enzima ramificadora de fitoglicogênio, que aumenta a expressão (Motto, 2003). No mutante *opaco2*, ocorre redução das zeínas, principalmente na da classe de 22 kDa, dentre outros genes. O locus *opaco2* codifica um fator de transcrição que ativa os genes cuja expressão é diminuída nos mutantes (Motto, 2003).

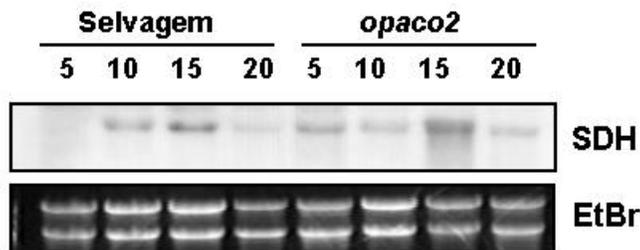
Pelo resultado dos ensaios de *Northern blot*, pode-se observar um aumento do número de transcritos de SDH nos mutantes *sugary1* e *shrunk2* (Figura 13). Nestes, a expressão de SDH é maior em todas as idades analisadas, e principalmente aos 25 DAP, idade em que ocorre grande diminuição dos transcritos de SDH nas sementes normais. A análise da expressão gênica da SDH em mutantes não havia sido realizada anteriormente, entretanto, sabia-se que a atividade enzimática da SDH no mutante *shrunk2* era aumentada em comparação com a semente normal (Doehlert e Kuo, 1990), corroborando os resultados encontrados.

O mutante *opaco2* tem aos 20 DAP uma expressão levemente maior de SDH do que o milho normal (Figura 14). Damerval e Guilloux (1998), por meio de análise de sementes de milho normais e mutantes *opaco2* em gel 2-D, encontraram proteínas de diversos metabolismos diferencialmente expressas. Dentre as proteínas com expressão aumentada em *opaco2*, eles encontraram um polipeptídeo correspondente à enzima sorbitol desidrogenase, corroborando os nossos resultados. O aumento da expressão do gene *SDH* neste mutante de proteínas de reserva pode ser devido ao

maior acúmulo de açúcares. De fato, sabe-se que o milho *opaco2* desidrata mais tardiamente, o que é um sinal de uma maior quantidade de açúcares. Não é raro que mutações na via de síntese de proteínas de reserva sejam acompanhadas por variações na síntese de amido (Giroux *et al.*, 1994). De qualquer forma, apesar das diferenças na expressão de *SDH* entre selvagem e mutante *opaco2*, a alteração verificada nos mutantes *sugary1* e *shrunkened2* é muito mais drástica do que aquela verificada no *opaco2* (Figuras 13 e 14).



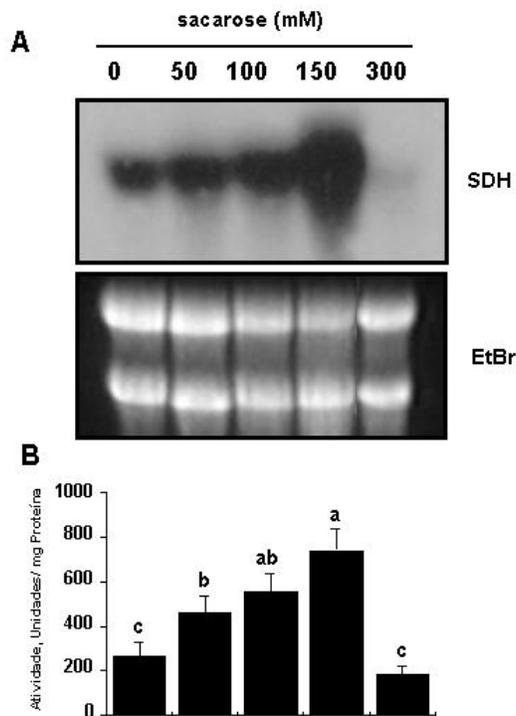
**Figura 13.** Expressão do transcrito da SDH nos mutantes *sugary1* e *shrunkened2*. SDH - Northern blot usando SDH como sonda (400 pb) durante o endosperma em desenvolvimento (15, 20 e 25 DAP) em diferentes mutantes de milho (Selvagem, *Sugary1* e *Shrunken2*); EtBr- Controle com RNA ribossomal corado com brometo de etídeo. Foram utilizados 12 µg de RNA total de sementes de milho.



**Figura 14.** Expressão do gene da SDH no mutante *opaco2*. SDH - Northern blot usando SDH como sonda (400 pb) em milho selvagem (5, 10, 15 e 20 DAP) e *opaco2* (5, 10, 15 e 20 DAP). EtBr- Controle com RNA ribossomal corado com brometo de etídeo. Foram utilizados 12 µg de RNA total de sementes de milho.

## **2.6. A expressão e atividade da SDH repondem à sacarose**

A expressão aumentada da SDH em mutantes pode indicar que a regulação do gene responde ao aumento dos açúcares, mais provavelmente a sacarose, pois vários genes são regulados por este açúcar, incluindo o gene da sacarose sintase (Giroux *et al.*, 1994). Para comprovar esta hipótese foram injetadas diferentes concentrações de sacarose na espiga de milho. Era esperada uma correlação positiva entre a quantidade de transcritos e a concentração de sacarose injetada. Como mostra a Figura 15 ocorreu um aumento da expressão gênica e da atividade enzimática conforme se aumentava a concentração de sacarose, até um platô onde o aumento da sacarose levou à inibição da SDH. Outros açúcares como manitol, frutose e sorbitol foram injetados e levaram à inibição da SDH, porém como não há certeza que estes açúcares, ao contrário da sacarose, que é o principal açúcar translocado do floema para a semente de milho, foram translocados para dentro da semente, esses resultados não foram conclusivos. De acordo com Giroux *et al.*, (1994), genes envolvidos na síntese de sacarose devem ser reprimidos pela sacarose, enquanto aqueles envolvidos na degradação da sacarose devem ser estimulados. Portanto, se deduz que a SDH esteja relacionada com a degradação de sacarose, conforme o esperado.

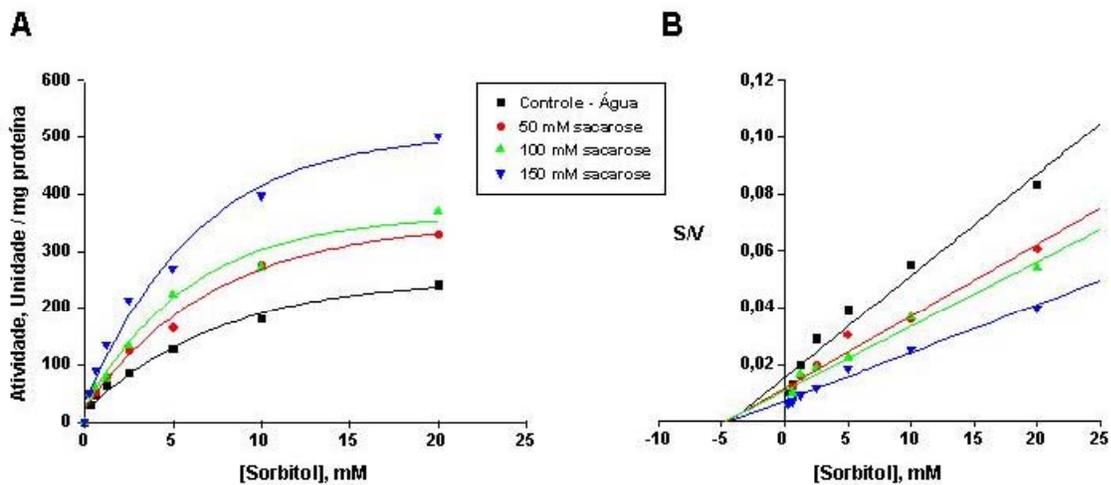


**Figura 15.** *Northern blot* e atividade enzimática para SDH de sementes de milho tratadas com diferentes concentrações de sacarose (0 a 300 mM). SDH - *Northern blot* usando SDH como sonda (400 pb). EtBr- Controle com RNA ribossomal corado com brometo de etídeo. B: Atividade da enzima SDH de endosperma de milho tratado com diferentes concentrações de sacarose (0 a 300 mM). A atividade foi feita a 30 °C, pH 9,0. A concentração de NAD usada foi de 2 mM. Os valores são a média de 5 ensaios. As letras correspondem ao teste ANOVA de um critério com pós-teste LSD,  $p < 0,05$ .

## 2.7. O aumento de atividade de SDH não está associado à fosforilação da enzima e parece decorrer apenas do aumento da transcrição

As mesmas sementes de espigas injetadas com sacarose foram também usadas em análise de cinética enzimática para verificar se a atividade aumentada da SDH, nas sementes de espigas injetadas com sacarose, é somente devido ao aumento da transcrição ou se estaria ocorrendo também aumento da atividade por modificação pós-traducional, como por exemplo, fosforilação. Por meio da variação da concentração do substrato sorbitol, observou-se que quanto maior a concentração do substrato, maior a atividade enzimática, até alcançar um platô onde a enzima atinge a sua velocidade máxima comportando-se de acordo com a cinética de Michaelis-Menten (Figura 16 A), o que corrobora o trabalho feito por Doehlert (1987a), no qual a enzima foi caracterizada em milho pela primeira vez. A partir destes dados, foi feita a conversão pelo método de Hanes-Woolf, para se obter os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  (Figura 16 B e

Tabela 2). O valor do Km encontrado neste trabalho é a metade do valor encontrado por Doehlert (1987a), provavelmente pelo fato do autor ter usado a enzima purificada, enquanto neste trabalho foi usado extrato bruto. Os nossos resultados mostraram que o Km se manteve constante nos diferentes extratos. A Vmax, ao contrário, foi maior nos extratos de sementes de espigas injetadas com sacarose. Este resultado indica que o aumento de atividade observado nas sementes de espigas injetadas decorre do aumento da quantidade da enzima presente, e não da ativação pós-traducional da mesma. Este resultado foi confirmado pelo tratamento do extrato protéico com fosfatase alcalina. Como mostra a Tabela 3 não houve redução na atividade SDH, mesmo quando o extrato foi tratado com altas doses de fosfatase alcalina. Portanto, estes resultados indicam que o controle do gene SDH se dá ao nível transcricional.



**Figura 16.** Atividade da SDH em sementes tratadas com diferentes concentrações de sacarose (0 a 150 mM). A: Curva de saturação da SDH, pH 9.0 a 30 °C. A concentração de NAD foi de 10 mM. B: Dados convertidos pelo método de Hanes-Woolf. Os valores são a média de 5 extrações.

**Tabela 2.** Valores de Km e Vmax da atividade de SDH em sementes de milho tratadas com diferentes concentrações de sacarose obtidos pelo método de Hanes-Woolf.

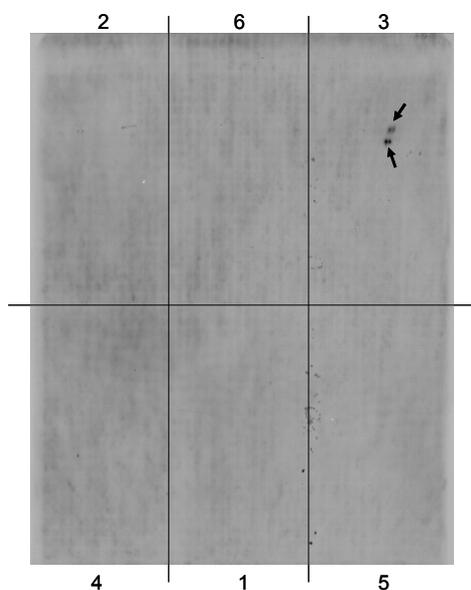
Tratamento	Km	Vmax
Controle	4,34	64,60
50 mM sacarose	4,28	86,21
100 mM sacarose	4,72	93,28
150 mM sacarose	4,26	138,89

**Tabela 3.** Efeito da defosforilação na atividade de SDH utilizando fosfatase alcalina (0-5 U).

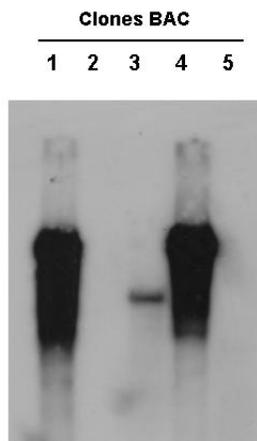
Fosfatase alcalina (U)	Atividade, unidade/mg proteína
0	627,22
0,25	608,48
0,5	644,53
1	640,20
2,5	547,92
5	648,85

## 2.8. Seqüenciamento do clone genômico da SDH

Apesar da caracterização da atividade enzimática da SDH ter sido feita por Doehlert já em 1987a, o gene que codifica esta enzima não havia sido descrito anteriormente. Para obtenção de uma seqüência genômica do gene *SDH* utilizou-se uma biblioteca comercial BAC (CUGI). Para identificação dos possíveis clones de *SDH*, os filtros da biblioteca BAC foram hibridizados com uma sonda de cDNA de *SDH* obtida do MAIZEST (Figura 17). Foram observados 38 clones positivos na hibridação, dos quais foram comprados os 5 clones que apresentaram sinal mais forte. A presença do gene nestes 5 clones foi verificada por *Southern blot* (Figura 18). Os clones 2 e 5 demonstraram ser falsos positivos. Prosseguiu-se o estudo com o clone 1. Para seqüenciar este clone, fez-se uma biblioteca shotgun de 1.440 subclones e seqüenciaram-se 672. Para fazer o agrupamento das seqüências foi criado um site (<https://carolina.cbmeg.unicamp.br/mzbacs/>), onde as seqüências eram depositadas, 'trimadas' e montadas. Foram obtidos um total de 100 *clusters* (Tabela 4). Destes, um *cluster* de 7.050 pb e um *singleton* de 892 pb eram referentes ao gene da sorbitol desidrogenase, o restante do BAC era constituído principalmente de *transposons*. Apesar de termos uma seqüência grande, faltava um pequeno fragmento entre o *cluster* e o *singleton*. Foi desenhado um par de *primers*, e o fragmento faltante de 200 pb foi amplificado e seqüenciado, obtendo-se uma região ininterrupta de 8.151 pb. De posse desta seqüência, foi feita a predição de ORFs (*Open Reading Frame*) com o 'Genscan' (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>), somente foi encontrada a ORF do gene da SDH. As seqüências foram depositadas no Genbank com os seguintes números de acesso: DQ191049 e DU132578 a DU133156 e ficarão disponíveis a partir de julho de 2006.



**Figura 17.** Resultado da hibridação de um dos filtros da biblioteca BAC de milho. A membrana é dividida em seis regiões e os clones se apresentam sempre aos pares. A seta indica um clone que provavelmente possui o gene que codifica a enzima sorbitol desidrogenase.

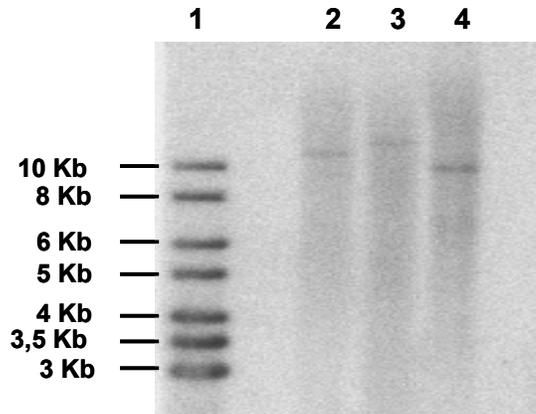


**Figura 18.** *Southern blot* para confirmar os clones BAC da CUGI utilizando como sonda um fragmento do gene *SDH* de 1.200 pb. Os clones BAC de milho de 1 a 5 foram digeridos com a enzima *Hind* III, que foi utilizada para a construção da biblioteca.

**Tabela 4.** Distribuição dos *reads* seqüenciados do BAC de milho

Total de <i>Reads</i> usados no <i>clustering</i>	Total de <i>singletons</i>	Total de <i>reads</i> nos contigs	Total de <i>contigs</i>	Total de <i>clusters</i> ( <i>singletons</i> + <i>contigs</i> )
579	59	520	41	100

Para verificar se o gene *SDH* era cópia única e, portanto, certificar-se que toda a informação sobre a regulação encontrava-se no clone seqüenciado, foi feito um *Southern blot*. Na Figura 19 é possível observar a presença de apenas uma banda na hibridação com diferentes enzimas e uma vez que este gene não apresenta sítio interno das enzimas utilizadas, foi possível inferir que este gene apresenta uma única cópia no genoma do milho.



**Figura 19.** *Southern blot* quantitativo para o número de cópias do que codifica a enzima sorbitol desidrogenase de milho. 1 – Ladder 1 kb (Fermentas), 2, 3 e 4 – DNA de milho digerido com *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III respectivamente.

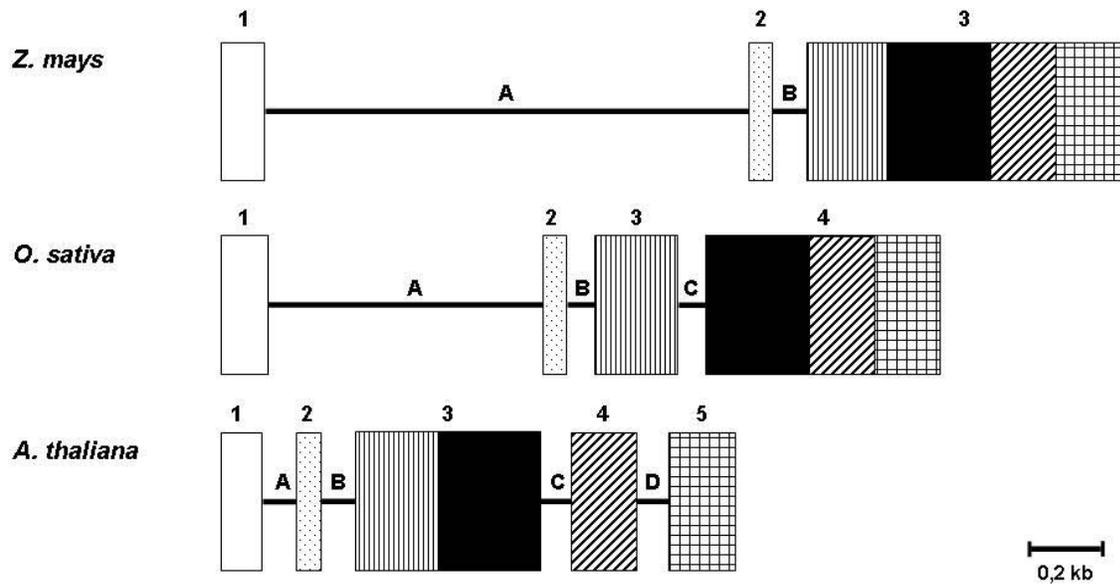
## 2.9. O gene *SDH* tem um intron a menos em comparação com o gene *SDH* de arroz

A estrutura do gene *SDH* foi obtida a partir da comparação da seqüência de cDNA de milho obtida do MAIZEST e do clone BAC sequenciado, utilizando o programa 'Sim4'. A região 5' não traduzida do gene seqüenciado tem 5052 pb e a 3' 539 pb. A seqüência de arroz possui uma alta similaridade (88%) com a de milho na região codificante, conforme mostra a Figura 20. O gene da *SDH* de milho tem três exons (124, 68 e 907 pb) e dois introns (1.382 e 99 pb), enquanto o de arroz tem quatro exons (133, 68, 236 e 670 pb) e três introns (788, 77 e 80 pb), ou seja, tem um intron a mais (Figura 21). A perda de introns durante a evolução é pouco compreendida, sendo que a perda de introns é mais freqüente que o ganho. Pensa-se que a perda de introns ocorre normalmente por meio da recombinação do gene com o cDNA (Cho *et al.*, 2004). O gene de *Arabidopsis* tem cinco exons (118, 68, 528, 188 e 192 pb) e quatro

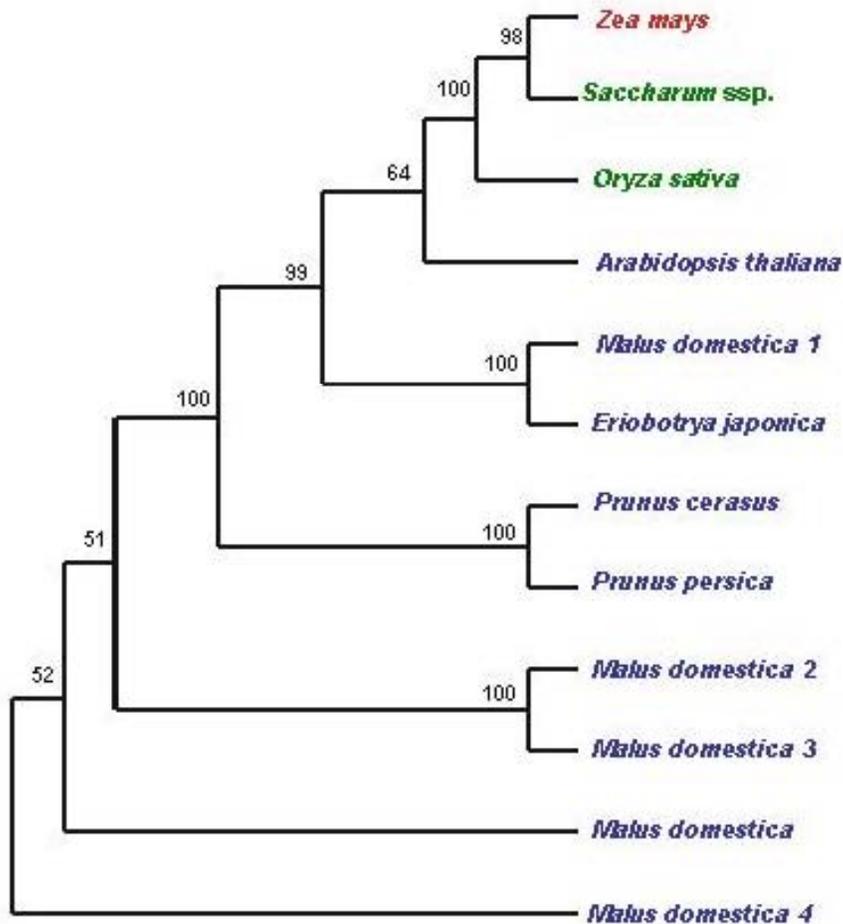
introns (96, 99, 85 e 94 pb), como mostra a Figura 21. Comparado com gene de arroz, o de milho parece ter perdido um intron, e ambos parecem ter perdido o último intron em relação ao gene *SDH* de *Arabidopsis*, conservando-se a presença dos dois primeiros introns. A análise filogenética feita pelo método Neighbor-Joining, com valores de *bootstraps* de 1.000 replicações entre a possível seqüência de proteína de milho e de outras plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas mostra que a SDH de milho e arroz são mais próximas evolutivamente, em relação à de *Arabidopsis* (Figura 22). Portanto, parece coerente sugerir que o gene *SDH* esteja de fato perdendo introns ao longo da evolução dessas espécies, assim como ocorre com os genes *Adh* de classe III (Luque *et al.*, 1994). O gene *SDH* de *Drosophila* tem 5 introns, enquanto o gene *SDH* de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bombyx mori* e *Homo sapiens*, que apresentam 0, 7 e 8 introns, respectivamente, mostrando um aumento do número de introns conforme a complexidade do genoma aumenta (Luque *et al.*, 1998).

Milho	1	ATGGGGAAGGGAGCCCAAGGGAGCGATGCGGCGGGCGG-----GCGGCGAGGTG
Arroz	1	ATGGGGAAGGGAGCGAAAGGAGCCGAGGCGGCGGGCGGCGGGTGGCCGAGCCCGTGGAG
Milho	52	GAGGAGAACATGGCGGCGTGGCTGGTTGCCAAGAACACCCTCAAGATCATGCCCTTCAAG
Arroz	61	GAGGAGAACATGGCGGCGTGGCTGGTTGGCGAAGAACACCCTCAAGATCATGCCCTTCAAG
Milho	112	CTCCCGCCCGTCCGGCCCTTATGATGTCCGCGTCCGATGAAGGCAGTGGGGATTGCGGC
Arroz	121	CTCCCGCCAGTTGGCC-TTATGATGTCCGTTCCGGATGAAGGCAGTGGGCATCTGCGGC
Milho	172	AGCGATGTGCACTACCTCAGGGAGATGCGCATCGCGCATTCGTGGTGAAGGAGCCGATG
Arroz	180	AGCGACGTGCACTACCTCAGGGAGATGCGCATGCGCATTCGTGGTGAAGGAGCCGATG
Milho	232	GTGATCGGGCACGAGTGCGCCGGCGGTGCTCGAGGAGTGGCCCGCGCGTGACGCACCTG
Arroz	240	GTGATCGGGCACGAGTGCGCCGGCGGTGATAGAGGAGTGGCAGCGCGCGTGACGCACCTC
Milho	292	TCCGTCGGCGACCGCGTGGCGCTCGAGCCGGCGTCAGCTGCTGGCGCTGCCGCACTGC
Arroz	300	GCCGTCGGCGACCGCGTGGCGCTCGAGCCGGCATCAGCTGCTGGCGCTGCAGGCACTGC
Milho	352	AAGGGCGGGCGGTACAACCTGTGCGAGGACATGAAGTTCTTCGCCACCCCGCCGTTGCAC
Arroz	360	AAGGGCGGGCGCTACAACCTCTGCGAGGACATGAAGTTCTTCGCCACCCCTCCCGTCCAC
Milho	412	GGCTCGCTGGGAACCAGGTGTGCACCCGGCCGACCTGTGCTTCAAGCTCCCGAGCGGG
Arroz	420	GGATCCCTCGCAACCAGATGTGCACCCGTGTGATCTGTGCTTCAAGCTGCCGAGAAC
Milho	472	GTGAGCCTGGAGGAGGGCGCCATGTGCGAGCCGCTGAGCGTGGGCGTGCACGCGTGCCGC
Arroz	480	GTGAGCCTGGAGGAGGGCGCCATGTGCGAGCCGCTGAGCGTGGGCGTGCACGCGTGCCGC
Milho	532	CGCGCGGGGGTGGGGCCGAGACGGGCGTGCTCGTGGTGGGCGCGGCCCATCGGCCTG
Arroz	540	CGCGCGACCGTGGGCCGAGACGGGGTGTGATCATGGGCGGGGCCCATCGGCCTG
Milho	592	GTGTGCTGCTGCGGCGCGCGGCTTCGGCGCGCGCGCGTGGTGTGCTGGATGTGGAC
Arroz	600	GTCACTCTGCTGGCGGCGCGCGCTTCGGCGCGACGCGCGTGTGATCGTGGACGTGGAC
Milho	652	GACCACCGCCTGGCGTGGCCAGGTCGCTGGCGGGACGGCCGTGGGGTGTGCGCC
Arroz	660	GAACACCGCCTCTCCGTGGCCGATCCCTCGCGCCGACGCCGCCGTGAGGGTGTGCGCG
Milho	712	CGCGCGGAGGACCTGGCGGACGAGGTGGAGCGCATCCCGCGGCCATGGGCTCGGACATC
Arroz	720	CGCGCGGAGGACCTGGCGGAGGAGGTGGAGCGGATCAGCGCGCGATGGGCGGGGACATC
Milho	772	GACGTGAGCCTGGACTGCGCCGGGTTTACAGCAAGACCATGTGACGGCGCTGGAGGCGACG
Arroz	780	GACGTGAGCCTGGACTGCGCCGGGTTTACAGCAAGACCGTGGCGACGGCGCTGGAGGCGACG
Milho	832	CGGCCCGGCGGGAAGGTGTGCCTGGTTCGGGATGGGCCACAACGAGATGACGTGCGCGCTG
Arroz	840	CGCGCGGCGGGAAGGTGTGCCTCGTTCGGGATGGGGACAACGAGATGACGTGCGCGCTG
Milho	892	ACGGCGGGCGGCGCGGGGAGGTGGACGTGGTGGCGTTCGGGTACAAGGACACCTGG
Arroz	900	ACGTTCGGCGGCGATCAGGGGAGGTGGACGTGGTGGGATATTCCGGTACAAGGACACCTGG
Milho	952	CCGCTGTGCATCGACTTCCTGCGCAGCGGCAAGGTGGACGTCAAGCCGCTCATCACCCAC
Arroz	960	CCGCTGTGCATCGACTTCCTGCGCAGCGGCAAGATCGACGTGAAGCCGCTCATCACCCAC
Milho	1012	CGCTTCGGCTTCTCGCAGCGGGACGTGGAGGAGGCTTCGAGGTACAGCCTCCCGGCGC
Arroz	1020	CGATTTCGGCTTCTCGCAGGAGGACGTGGAGGAGGCTTCGAGGTACAGCCTCCCGGCGC
Milho	1072	GATGCCATAAAAATCATGTTCAACCTCT
Arroz	1080	GACGCCATCAAGATCATGTTCAACCTCT

**Figura 20.** Alinhamento da região codificante de milho e arroz utilizando os programas ClustalX e Boxshade. Em preto está representada a conservação das seqüências e em cinza a moderada conservação das seqüências nucleotídicas.



**Figura 21.** Esquema da estrutura do gene da sorbitol desidrogenase de *Z. mays* (milho), *O. sativa* (arroz) e *A. thaliana* (*Arabidopsis*). Os números indicam os exons e as letras os introns. As distâncias são proporcionais aos tamanhos em pb.

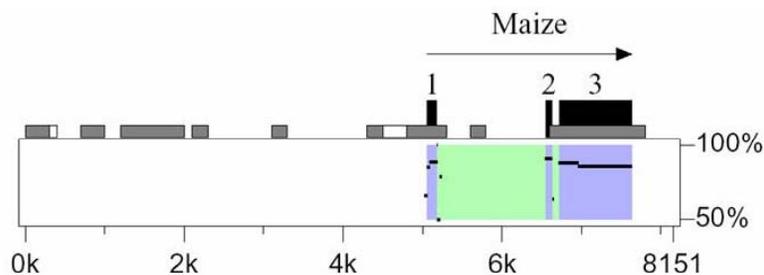


**Figura 22.** Análise filogenética da proteína SDH em angiospermas. A análise filogenética dos genes da SDH foi feita pelo método Neighbor-Joining com valores de bootstraps de 1.000 replicações. *Zea mays* está em vermelho, outras monocotiledôneas em verde e dicotiledôneas em azul. *Zea mays* (milho), *Saccharum spp.* (cana-de-açúcar), *Oryza sativa* (arroz), *Arabidopsis thaliana*, *Malus domestica* (maçã), *Eriobotrya japonica* (nêspera), *Prunus cerasus* (cereja), *Prunus persica* (pêssego).

## 2.10. A região regulatória no intron 1 controla a intensidade da expressão de SDH

Partindo da premissa de que elementos regulatórios são conservados ao longo da evolução, foi feita a comparação do DNA genômico de arroz e milho, visando encontrar possíveis regiões conservadas em áreas não codificantes, porém como mostra a Figura 23, apenas as regiões codificantes mostraram-se conservadas, podendo indicar uma distância evolutiva muito grande a ponto de não se conservarem os elementos regulatórios destas duas espécies. Foram testados diversos programas

de alinhamento de seqüências, como sugerido por Nardone *et al.*, (2004), porém todos eles apresentaram o mesmo resultado.



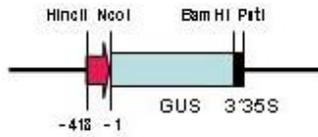
**Figura 23.** Resultado da comparação das seqüências de *SDH* de milho e arroz realizada pelo programa “Advanced Pipmaker”. Neste gráfico a cor verde representa intron e a azul exon. A região codificante está indicada pela seta. Os quadrados pretos indicam os exons do milho, os quadrados cinzas indicam região com  $CpG/GpC \geq 0,75$ , os quadrados brancos indicam região com  $CpG/GpC \geq 0,60$ . As regiões com no mínimo 50% de similaridade estão indicadas pelas linhas pretas.

Como não houve similaridade entre as seqüências não codificantes de milho e arroz, decidiu-se testar a presença de elementos regulatórios por meio de ensaios experimentais. Foram feitas três construções de expressão transiente, utilizando a seqüência regulatória do gene *SDH* de milho e o gene repórter *GUS*. A primeira construção continha 0,5 kb de região promotora da *SDH* e foi chamada pRT0,5SDHGUS, a segunda continha 2,0 Kb da região promotora de *SDH* e foi chamada pRT2,0SDHGUS e uma terceira construção com 2,0 Kb da região promotora e o primeiro exon e intron da *SDH*, foi chamada pRT3,6SDHGUS (Figura 24). Esta última construção foi feita para investigar o primeiro intron, uma vez que, normalmente em plantas, o intron localizado mais próximo à região 5' contém os elementos regulatórios (Luehrsen e Walbot, 1991; Clancy e Hannah, 2002, Rose, 2002; Jeong *et al.*, 2006). Como controle da transformação, utilizou-se uma construção com o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (pRT35SGUS).

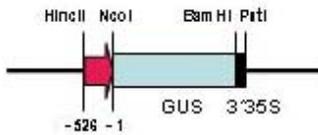
Inicialmente, foram bombardeados sementes e coleóptiles de milho. Como mostram as Figuras 24 e 25, as sementes e os coleóptiles bombardeados com a construção pRT3,6SDHGUS apresentaram uma quantidade maior de pontos azuis do que as outras construções, inclusive maior que o controle, tanto nas sementes quanto nos coleóptiles. As sementes bombardeadas com pRT2,0SDHGUS apresentaram uma

maior quantidade de pontos azuis do que as bombardeadas com pRT0,5SDHGUS. Inversamente, em coleóptiles o pRT0,5SDHGUS levou a um número maior de pontos que o pRT2,0SDHGUS. Tanto as sementes quanto os coleóptiles bombardeados com a construção controle, pRT35SGUS, apresentaram um maior número de pontos do que as bombardeadas com as construções pRT0,5SDHGUS e pRT2,0SDHGUS (Figuras 24 e 25). Os dados obtidos permitem inferir que o controle da tecido-especificidade pode estar na região de até 500 pb da região promotora, pois esta região foi suficiente para obter pontos azuis localizados apenas na região do endosperma. O fato de haver expressão também no coleóptile não é incomum a este tipo de ensaio, mas provavelmente representa um artefato da técnica, pois genes que regulam as prolaminas, que são endosperma-específicos, também apresentam pontos de transformação em coleóptiles (Freitas *et al.*, 1994). Também podemos inferir a partir dos resultados que o intron 1 é o principal responsável pela intensidade da expressão do gene *SDH* em milho, ou seja, deve conter um elemento “enhancer”.

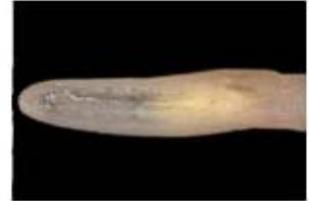
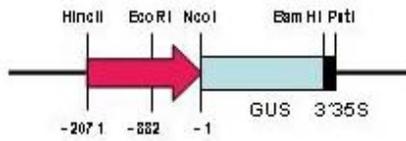
**pRT35SGUS**



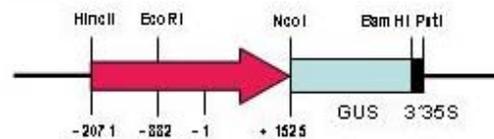
**pRT0,5SDHGUS**



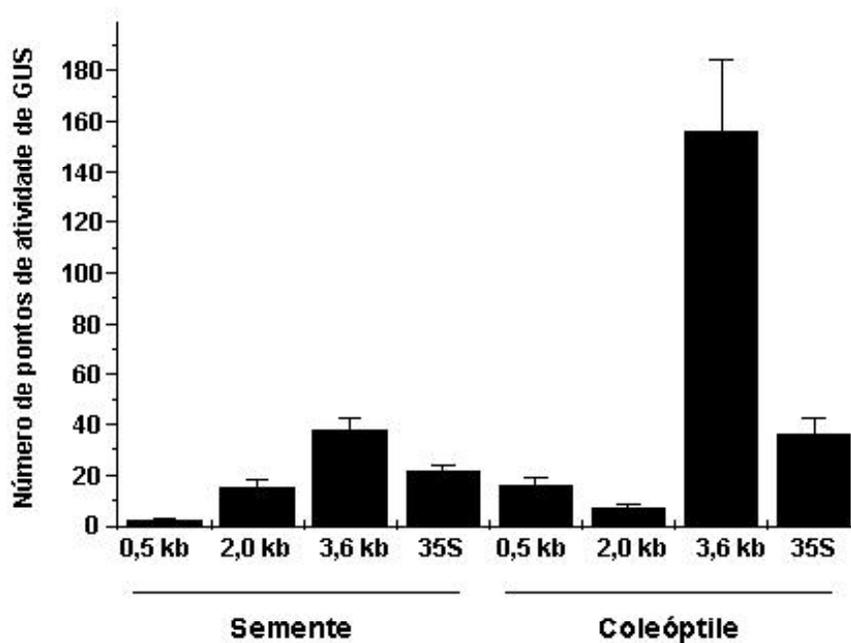
**pRT2,0SDHGUS**



**pRT3,6SDHGUS**



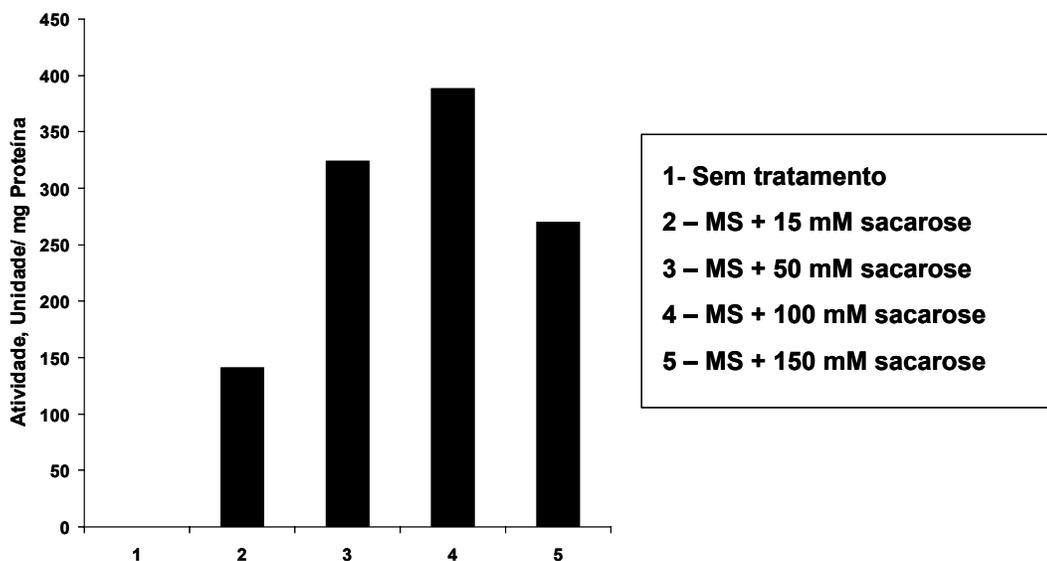
**Figura 24.** Esquema das construções com as regiões regulatórias da SDH (à esquerda), sementes transformadas (ao meio) e coleóptiles transformados (à direita). Os resultados das transformações estão ao lado das respectivas construções. Os pontos azuis indicam os pontos de atividade de GUS.



**Figura 25.** Gráfico da expressão transiente em sementes e coleóptiles transformados com as construções pRT0,5GUS (0,5 Kb), pRT2,0GUS (2,0 Kb), pRT3,6GUS (3,6 Kb) e pRT35SGUS (35S). As barras indicam a média de pontos de atividade de GUS de 6 repetições.

### 2.11. A transcrição do gene *SDH* é ativada por sacarose e hipoxia

Para conhecer melhor o modelo experimental de transformação transitória de coleóptiles, com especial atenção à biologia implicada na expressão do gene *SDH*, foi testado se os coleóptiles tinham atividade de *SDH* e se esta era ativada em presença de sacarose, assim como verificado em sementes de espigas injetadas com sacarose. Como mostra a Figura 26, os coleóptiles não apresentam atividade de *SDH*, porém quando foram cultivados em presença de sacarose por 6 horas, a atividade de *SDH* foi induzida, seguindo uma curva semelhante à encontrada em sementes (Figura 15).



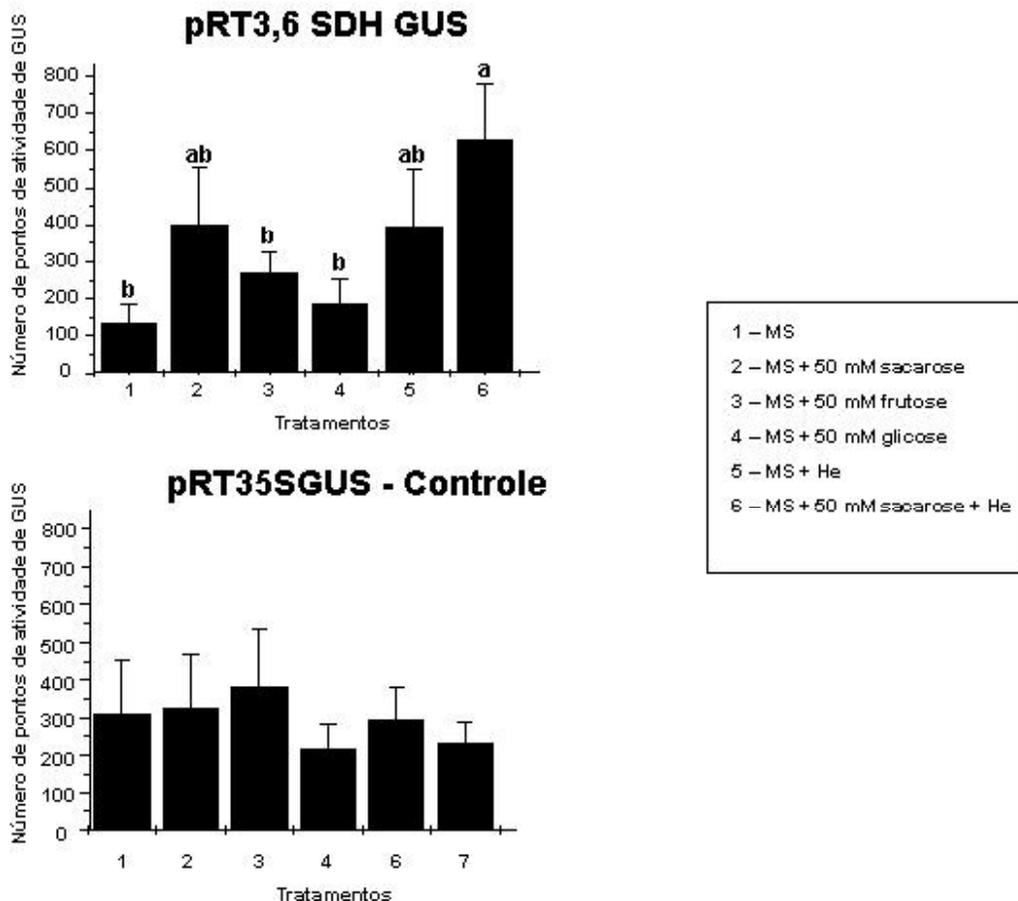
**Figura 26.** Atividade da enzima SDH de coleóptile de milho tratado com diferentes concentrações de sacarose (15-150 mM) e coleóptiles não tratados, como controle. A reação foi feita a 30 °C, pH 9.0. A concentração de NAD usada foi de 2 mM.

Ao verificar que a expressão do gene SDH também é induzida por sacarose nos coleóptiles em cultura, de certa maneira, dispunha-se de um modelo experimental apropriado para avaliar *in vitro* o efeito indutor da sacarose na transcrição do gene SDH, confirmando os resultados obtidos no experimento de injeção de sacarose nas espigas (Figuras 15 e 16). Além disso, aproveitou-se para avaliar o efeito da hipoxia, que é uma condição encontrada no endosperma amiláceo (Rolletschek *et al.*, 2005), onde se localiza a maior expressão de SDH (Figura 12).

Coleóptiles de milho foram bombardeados com a construção pRT3,6SDHGUS, e cultivados em meio líquido contendo diferentes açúcares, como a sacarose, glicose e frutose. Para avaliar o efeito da hipoxia, o meio líquido com sais MS foi borbulhado com hélio. Como mostra a Figura 27, a expressão do *SDH* é aumentada na presença de sacarose e hipoxia, e quando os coleóptiles foram submetidos a ambas condições houve um aumento ainda maior da expressão do *SDH*. Ao contrário, a frutose e a glicose não parecem ter efeito significativo na expressão do *SDH*, desta maneira descartando também a hipótese de que o aumento da expressão fosse causado por estresse osmótico. Além disso, o promotor constitutivo 35S (Construção pRT35SGUS) não respondeu a nenhum dos tratamentos (Figura 27). Apesar dos experimentos de bombardeamento apresentarem alta variabilidade entre as repetições, a análise

estatística dos dados permite concluir que tanto a sacarose quanto a hipoxia tem um efeito indutor e aditivo na transcrição do gene *SDH* (Figura 27). Este resultado é corroborado pelos experimentos de injeção de sacarose na espiga (Figura 15) e explica àquele obtido na análise da expressão de *SDH* nos mutantes *sugary1* e *shrunk2* (Figura 13). As construções pRT0,5SDHGUS e pRT2,0SDHGUS também foram avaliadas, mas o baixo número de pontos azuis obtidos (dados não apresentados), aliado à mencionada variabilidade dos resultados, não permitem tecer conclusões confiáveis.

A resposta à hipoxia e à sacarose parecem estar normalmente relacionadas nos genes do metabolismo de açúcares, como o gene da sacarose sintase de milho, que também responde a ambos estímulos (Zeng *et al.*, 1998). Aparentemente, o aumento da expressão mediado pela sacarose é mediado pelo fluxo metabólico de carbono, mais do que pelos níveis da sacarose. A falta de oxigênio pode interromper o ciclo de Krebs, comprometendo o fluxo metabólico da glicólise. Se este é de fato o caso, a baixa quantidade de oxigênio também pode alterar este sistema. A maior parte dos genes diminui a expressão quando estão em condições com pouco oxigênio, porém alguns genes como a sacarose sintase não. Embora a sacarose sintase e a invertase possam ambas clivar sacarose, a expressão da invertase diminui em condições com pouco oxigênio, ao contrário da sacarose sintase, que aumenta. Desta forma, tanto o açúcar quanto os níveis de oxigênio podem alterar o fluxo de carbono por meio da primeira etapa da glicólise, que é catalizada pelas hexoquinases, que também mediam a primeira etapa na via de sinalização dos açúcares (Zeng *et al.*, 1998 e Koch *et al.*, 2000).



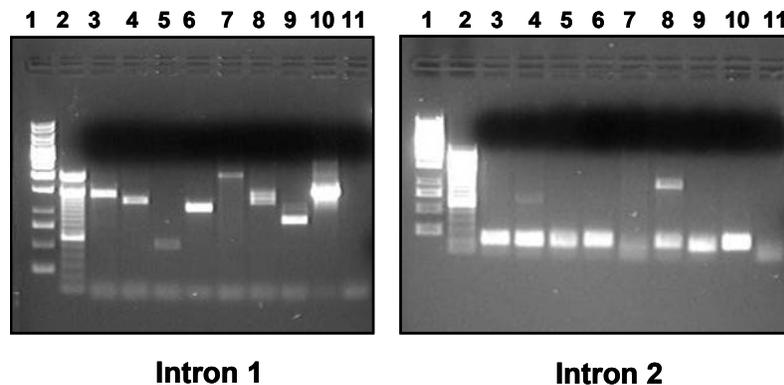
**Figura 27.** Gráfico da expressão transiente de coleóptiles cultivados com diferentes açúcares e submetidos a hipoxia. Os coleóptiles foram cultivados em meio líquido contendo: sais MS (1), sais MS e 50 mM de sacarose (2), sais MS e 50 mM de frutose (3), sais MS e 50 mM de glicose (4), sais MS e hélio borbulhado no meio (5) e sais MS com 50 mM de sacarose e hélio borbulhado no meio (6). Os coleóptiles foram transformados com as construções pRT3,6GUS e pRT35SGUS, como controle. As barras indicam a média do número de pontos azuis (atividade de GUS) e desvio padrão (n=5 repetições).

## 2.12. Possíveis elementos cis-regulatórios no intron 1 do gene *SDH*

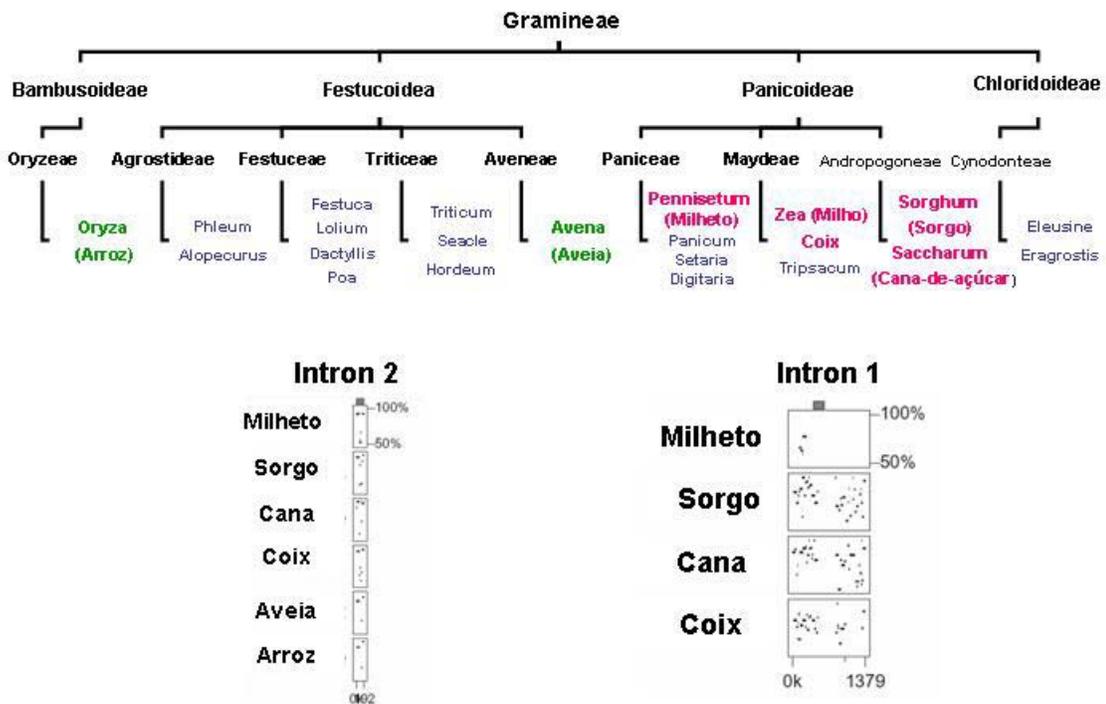
Como apresentado anteriormente, a tentativa de encontrar possíveis elementos regulatórios por meio do alinhamento das seqüências de *SDH* de milho e arroz ou *Arabidopsis* não foi bem sucedida, talvez pela distância evolutiva entre essas espécies. Decidiu-se então clonar e seqüenciar o primeiro e segundo intron de espécies mais próximas do milho, como *Coix*, milheto, sorgo, aveia e cana-de-açúcar.

Como mostra a Figura 28, observou-se uma diferença de tamanho no intron 1 e uma conservação do tamanho do intron 2 entre as espécies testadas. É interessante

notar que o intron 1, que regula a expressão gênica em milho, em todas as espécies apresenta-se maior do que o intron 2, o que ocorre também em alguns outros introns “regulatórios”, como o do gene da sacarose sintase de milho (Clancy e Hannah, 2002) e da profilina de *Arabidopsis* (Jeong *et al.*, 2006). Quando as seqüências foram comparadas, observamos que o intron 2 apresentava muito mais regiões conservadas entre espécies de tribos de sub-famílias diferentes, enquanto que o intron 1 apresentava regiões conservadas apenas entre tribos mais próximas, pertencentes a mesma sub-família (Figura 29). É bastante intrigante que justamente o intron 1, onde se localizam as regiões regulatórias pareça estar sofrendo tanta alteração ao longo da evolução das espécies, enquanto que o intron 2 parece bem mais conservado (embora não saibamos ainda se o intron 2 exerce alguma função regulatória responsável pela sua maior conservação ao longo da evolução).



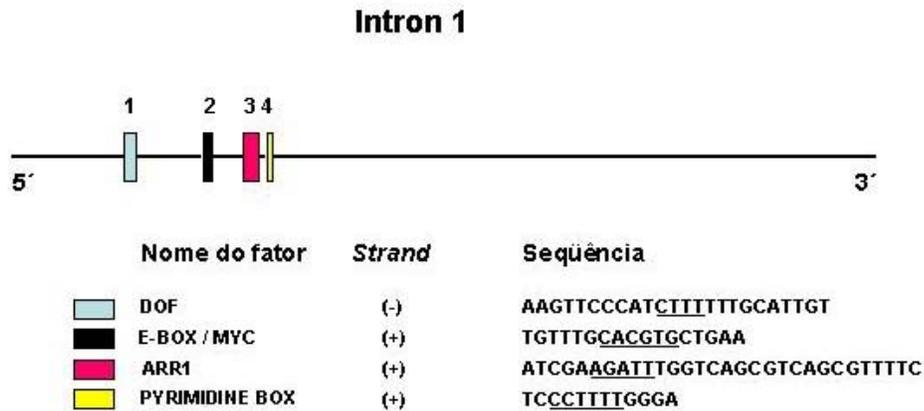
**Figura 28.** Amplificação dos introns 1 e 2 de diferentes espécies de gramíneas. 1 – Ladder 1 Kb Fermentas, 2 – Ladder 100 pb Invitrogen, 3 – Milho, 4 – *Coix*, 5 – Milheto, 6 – Sorgo, 7 – Aveia, 8 – Cana, 9 – Arroz, 10 – BAC (Controle positivo), 11 – Controle negativo (sem DNA).



**Figura 29.** Classificação das Gramineae mostrando a relação entre os cereais cultivados e comparação do intron 1 e 2 de SDH de milho com diferentes gramíneas. As seqüências dos introns 1 e 2 de milho foram comparadas com as seqüências das demais espécies utilizando o programa Pipmaker. Os traços nos gráficos indicam a similaridade com mais de 50% das seqüências nucleotídicas. Na classificação das gramíneas estão em verde as espécies com similaridade no segundo intron, porém não no primeiro; em vermelho estão as espécies com similaridades no segundo e primeiro intron e em azul as espécies que não foram testadas.

Foram encontrados quatro possíveis elementos regulatórios conservados, com total homologia, no intron 1 comuns a milho, milheto, sorgo, cana-de-açúcar e Coix, como mostra a Figura 30. São eles DOF, E-BOX/MYC, ARR1 e PYRIMIDINE. O DOF é único em plantas, foi isolado de milho e é um fator endosperma específico que se liga ao *Prolamin Box* (Yanagisawa e Schmidt, 1999). O motivo E-BOX/MYC está relacionado com resposta à desidratação e outros fatores abióticos (Oh *et al.*, 2005). O motivo ARR1 está envolvido na ligação ao DNA e ativação da transcrição por citoquininas (Sakai *et al.*, 2000). E finalmente o motivo PYRIMIDINE que é um elemento cis do complexo GARE que responde à giberelina e está envolvido na repressão por açúcares (Morita *et al.*, 1998). Para verificar a presença do fator de transcrição correspondente a cada um destes sítios de ligação, fez-se uma busca no MAIZEST e foram encontradas possíveis proteínas para DOF, E-BOX/MYC e

PYRIMIDINE, e uma proteína de ligação ao DNA para ARR1. Os elementos regulatórios aqui descritos devem ser considerados apenas como informação preliminar até que ensaios experimentais confirmem sua funcionalidade na regulação da expressão do gene *SDH*. Entretanto, o fato de não termos encontrado estes elementos nas espécies mais distantes do milho (aveia e arroz), já pode ser uma indicação de diferenças no metabolismo e função do sorbitol nas sementes dessas espécies.



**Figura 30.** Esquema da distribuição dos elementos regulatórios no intron 1 da *SDH* de milho. Os fatores estão localizados em escala e indicados por cores. A tabela indica em qual *strand* está o fator e a seqüência onde foram localizados os fatores. As seqüências são similares a milho, *Coix*, milheto, sorgo e cana-de-açúcar. A seqüência sinal está sublinhada.

### PAPEL DO SORBITOL NA SEMENTE DE MILHO - NUTRIÇÃO DO EMBRIÃO?

#### 1. INTRODUÇÃO

Nas sementes de milho em desenvolvimento o principal açúcar translocado do floema para semente é a sacarose. Existem dois mecanismos de quebra de sacarose quando esta chega do floema. Ela pode ser hidrolizada pela invertase, formando glicose e frutose, ou alternativamente, pode ser metabolizada pela sacarose sintase na presença de UDP para formar frutose e UDP-glicose. Em ambos os casos, a frutose é um dos produtos. Até o momento, sabe-se apenas que a frutose pode ser fosforilada pela hexoquinase e que posteriormente segue, por diversas outras etapas, até o amido (Figura 4B – Capítulo I). Vários artigos descreveram a presença das hexoquinases em sementes de milho (Cox e Dickinson, 1973, Tsai *et al.*, 1970 e Doehlert, 1987b). Porém os níveis da atividade das hexoquinases são baixos quando comparados com os da invertase e da sacarose sintetase (Tsai *et al.*, 1970 e Doehlert, 1987b). Esta observação sugere que a atividade da hexoquinase pode limitar a utilização de sacarose pelas sementes em desenvolvimento. Além disto, a frutose em excesso pode inibir a sacarose sintase (Morell e Copeland, 1985; Doehlert, 1987b), o que poderia acarretar, em caso extremo, na interrupção da translocação da sacarose do floema para a semente (Koch, 1996).

Doehlert (1987a) descobriu uma via alternativa de utilização da frutose no endosperma, catalizada pela enzima sorbitol desidrogenase. A sorbitol desidrogenase de semente de milho é capaz de reduzir frutose em sorbitol na presença de NADH e oxidar sorbitol em frutose na presença de NAD. Entretanto, a correlação negativa encontrada entre a frutose e a atividade de SDH (Doehlert e Kuo, 1990) indica que a direção da reação, normalmente, se dá de frutose para sorbitol. Sendo assim, a sorbitol desidrogenase apresentou-se como uma enzima capaz de aliviar o acúmulo de frutose no endosperma. Faltava contudo, determinar qual o próximo passo na metabolização do sorbitol (Figura 6).

Apesar da alta atividade de SDH no endosperma amiláceo, o sorbitol não é acumulado no endosperma, indicando que é um metabólito intermediário. Doehlert (1988) sugeriu que o sorbitol poderia ser posteriormente convertido em glicose pela atividade de uma aldose redutase (AR), como acontece em mamíferos. Entretanto, até o presente momento, não foi possível detectar uma atividade de AR no endosperma de milho, ficando, portanto, a questão do destino do sorbitol em aberto. Durante o desenvolvimento desta etapa do trabalho da tese, estudando os dados da literatura, pensou-se em duas alternativas, não excludentes, para o destino do sorbitol sintetizado no endosperma do milho.

Uma primeira alternativa para o uso do sorbitol no endosperma seria sua reconversão em frutose, pela mesma SDH. Ou seja, o sorbitol serviria como um alívio temporário da alta concentração de frutose, que além disso poderia também controlar o balanço NAD/NADH .

Uma segunda alternativa para o uso do sorbitol produzido no endosperma seria sua translocação para o embrião. Carey *et al.*, (1982) descreveram o acúmulo de sorbitol pelo embrião de milho em desenvolvimento. Uma vez que o embrião não sintetiza sorbitol (não tem atividade SDH), a única explicação para o seu acúmulo no embrião seria a importação do sorbitol sintetizado no endosperma. Esta possibilidade parece bastante interessante se considerarmos que embora existam diversas publicações em relação ao transporte de carbono do floema para a base da semente, nada se sabe sobre o transporte entre o endosperma e o embrião (Rolletschek *et al.*, 2005).

A semente de milho em desenvolvimento é suprida pela sacarose que vem do floema, através do pedicelo e células de transferência até os principais compartimentos do endosperma e embrião. A sacarose é introduzida no endosperma por transferência apoplástica (parede celular), pelos transportadores de sacarose, de maneira ativa. Uma vez dentro das células do endosperma, a sacarose é clivada em hexoses (glicose, UDP-glicose, frutose), que são translocadas dentro do endosperma por transferência simplástica (citoplasma), pelos plasmodesmatas (Giaquinta *et al.*, 1983, Nolte e Koch, 1993) .

A difusão das hexoses segue em direção a parte superior do endosperma onde o estoque de amido se inicia. O embrião está distante da região de transferência da

semente e não existe sistema vascular conectando o pedicelo da semente ao embrião. O fluxo de fontes de carbono para dentro do embrião parece ser fortemente controlado por características da região do endosperma que circunda o embrião, porém os mecanismos específicos são desconhecidos, mas provavelmente envolvem as invertases e seus inibidores (Rolletschek *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados neste capítulo buscaram o entendimento do papel do sorbitol e da SDH na semente de milho, bem como seus papéis no fluxo de carbono do endosperma para o embrião.

## **2. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.1. Aldose redutase – Uma alternativa para metabolização do sorbitol**

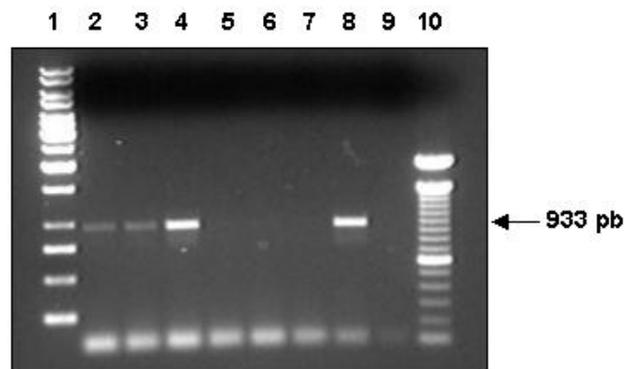
Procurando desvendar qual era o destino do sorbitol produzido no endosperma, e dispondo do banco de EST de endosperma e outros bancos públicos de ESTs de milho, fez-se uma busca por genes homólogos a enzimas capazes de utilizar o sorbitol, como substrato, como a aldose redutase (AR), NADP-dependente sorbitol desidrogenase e sorbitol oxidase. Destes, apenas o gene da AR foi encontrado expresso na semente de milho. A AR seria capaz de converter sorbitol em glicose, como foi sugerido por Doehlert (1988). As aldose redutases são enzimas monoméricas NADPH-dependente que têm especificidade por diversos açúcares e aldeídos aromáticos. O único gene/enzima de AR já descrito em cereais foi em cevada, que apresenta expressão no embrião da semente. O substrato da AR do embrião da cevada ainda não foi definido. A enzima apresenta baixa afinidade a substratos como glicose, gliceraldeído e eritrose (Roncarati *et al.*, 1995), sendo que o sorbitol não foi testado (Bartels, D. comunicação pessoal). Até agora não foi encontrada atividade de AR na semente de milho, provavelmente devido à dificuldade em isolar a enzima ativa.

Como mostra a Tabela 5, o transcrito AR encontrado é muito mais expresso no embrião de milho do que no endosperma. O fato de encontrarmos AR também nas pontas de raízes e outros tecidos não é incomum, uma vez que o mesmo ocorre com outras proteínas-chave do metabolismo de carboidratos da semente, como as invertases e sacarose sintase (Koch, 2004). Por meio de ensaios de RT-PCR (*reverse-*

*transcriptase* PCR) confirmamos que a AR de milho, embora expressa em diversos tecidos, mas não é expressa no endosperma e sim no embrião (Figura 31).

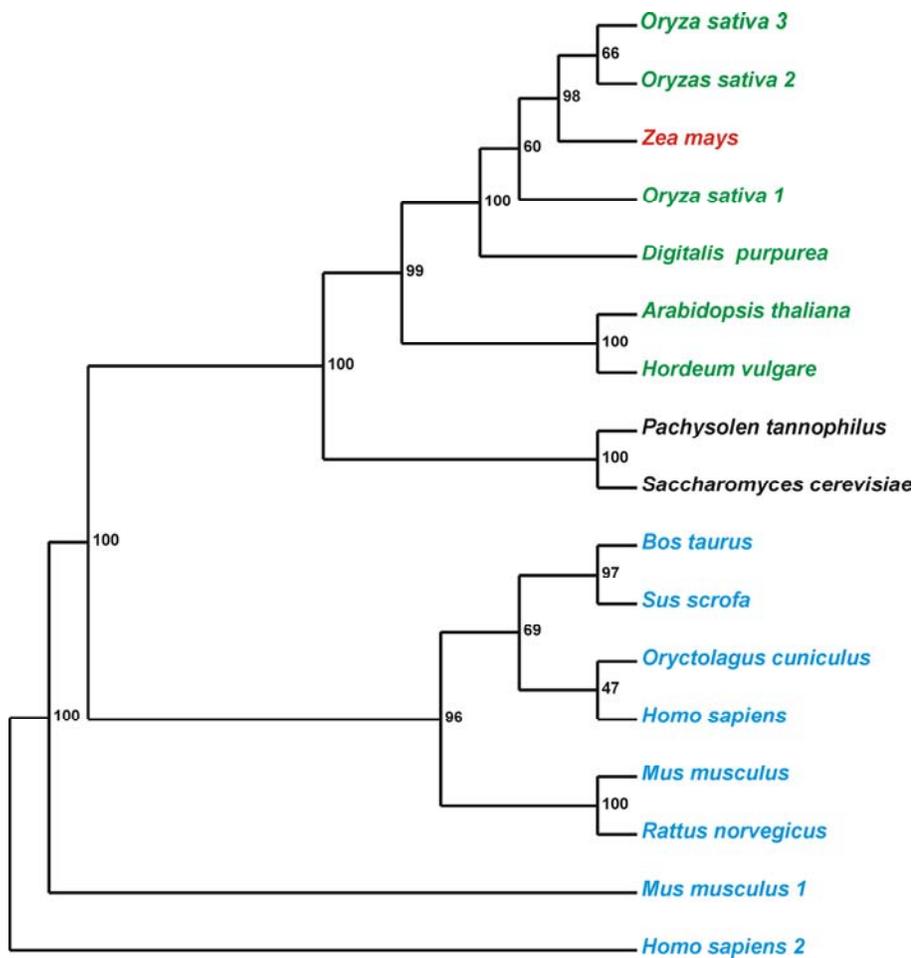
**Tabela 5.** Distribuição do ESTs- da possível aldose redutase em bibliotecas de cDNA de diferentes tecidos. Número normalizado de ESTs por biblioteca (x10.000).

Gene	Endosperma	Folha	Raiz	Pendão	Plântula	Embrião
Aldose Redutase	0,62	1,44	44,50	3,31	0,72	5,68



**Figura 31.** Análise de RT-PCR amplificando um fragmento relativo a AR. 1 – Ladder 1 kb Fermentas, 2 – Raiz, 3 - Folha, 4 – Embrião, 5 – Endosperma 10 DAP, 6 – Endosperma 15 DAP, 7 – Endosperma 20 DAP, 8 – Coleóptile, 9 – Controle negativo (sem DNA) e 10 – Ladder 100 pb Invitrogen.

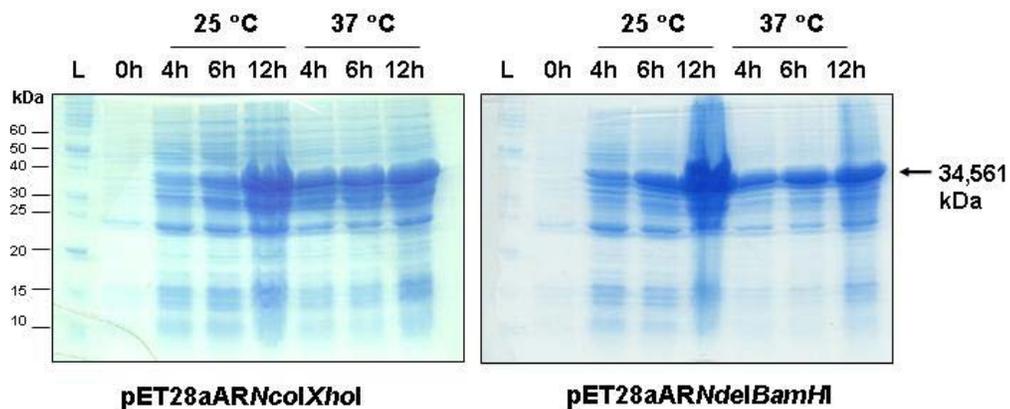
O gene da aldose redutase de milho quando comparado com o de cevada (*H. vulgare*) (Roncarati *et al.*, 1995) fica distante evolutivamente, o que pode sugerir diferença na função (Figura 32) e a possibilidade de que em milho a AR seja capaz de usar o sorbitol como substrato.



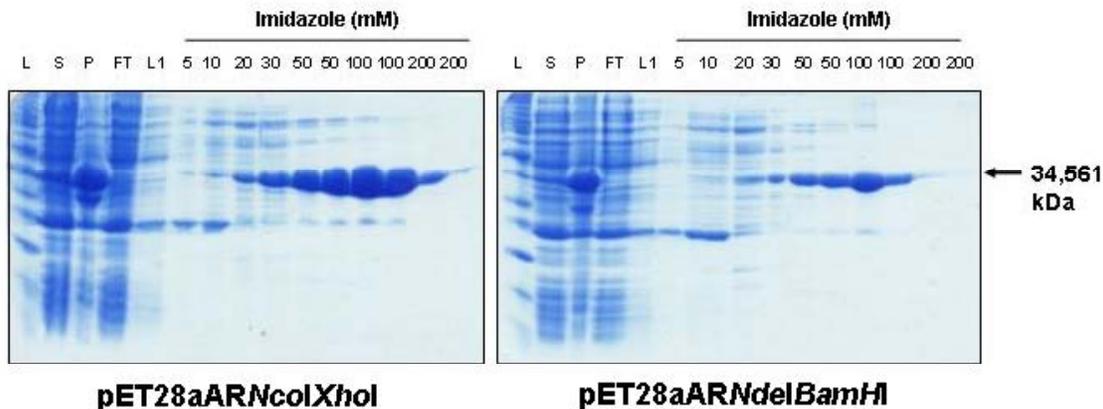
**Figura 32.** Análise filogenética da aldose redutase em diferentes espécies. A análise filogenética da proteína aldose redutase foi feita pelo método NJ com valores de bootstraps de 1000 replicações. *Zea mays* está em vermelho, plantas em verde, microorganismos em preto e animais em azul. *Oryza sativa* (arroz), *Zea mays* (milho), *Digitalis purpurea* (Common foxglove), *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare* (cevada), *Pachysolen tannophilus* (levedura), *Saccharomyces cerevisiae*, *Bos taurus* (boi), *Sus scrofa* (porco), *Oryctolagus cuniculus* (coelho), *Homo sapiens*, *Mus musculus* (camundongo), *Rattus norvegicus* (rato).

Devido às dificuldades em medir a atividade da AR e visando caracterizar e verificar a capacidade desta enzima de milho em metabolizar o sorbitol em glicose, o cDNA da AR (MAIZEST) foi clonado em pET28a, com o His-tag na região N-terminal (pET28aNcoI/XhoI) e C-terminal (pET28aNdeI/BamHI). Inicialmente foram testadas para as duas construções a expressão nas temperaturas de 25 °C e 37 °C e nos tempos de indução 4, 6 e 12 horas. Como mostra a Figura 33, a condição de indução por 6 horas à 37 °C apresentou o melhor resultado para ambas as construções, em termos de rendimento por tempo. Uma vez padronizada a condição de indução, foi feita a

expressão em uma escala maior e a proteína foi purificada primeiramente em uma coluna de afinidade com níquel. Conforme mostra a Figura 34 as frações eluídas entre 50 e 200 mM de imidazol apresentaram a maior parte da AR (34,561 kDa) e uma menor quantidade de contaminantes. Podemos perceber também nesta figura que a construção com o His-tag na região N-terminal apresentou um rendimento maior do que a construção com o His-tag na região C-terminal. Portanto, a partir deste ponto foi utilizada apenas a construção pET28aARNcolXhoI. As frações eluídas foram dializadas e submetidas a uma purificação em coluna aniônica. Os testes de atividade com a proteína AR recombinante purificada ainda não foram realizados, mas serão fundamentais para confirmar a afinidade desta enzima pelo sorbitol.



**Figura 33.** Expressão da AR de milho em pRill com as construções pET28aNcolXhoI e pET28aNdelBamHI. L – Ladder de proteína BenchMark (Invitrogen). Expressão induzida de 0 a 12 horas em 25 e 37 °C. A seta indica a banda correspondente a AR (34,561 kDa).



**Figura 34.** Etapas de purificação da proteína AR nas construções pET28aNcoI/XhoI e pET28aNdeI/BamHI. L - Ladder de proteína BenchMark (Invitrogen), S – Fração solúvel, P – Precipitado, FT (Flow-through) – sobrenadante que não se ligou a resina, L1 – lavado e gradiente de imidazol de 5 a 200 mM. A seta indica a banda correspondente a AR (34,561 kDa).

## 2.2. Identificação de um transportador de sorbitol no endosperma de milho

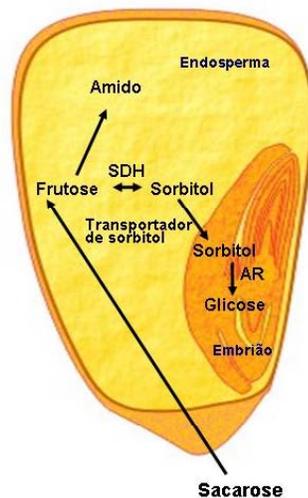
O embrião não expressa a SDH, portanto, a AR não teria o sorbitol como substrato nesse tecido, a não ser que o mesmo fosse translocado do endosperma para o embrião. Revisando a bibliografia, verificamos que Carey *et al.* (1982) identificaram quantidades crescentes de sorbitol no embrião em desenvolvimento. Uma vez que o embrião não sintetiza sorbitol, como explicar o acúmulo do mesmo nesse tecido? Duas hipóteses poderiam ser formuladas. Na primeira, menos plausível, o sorbitol encontrado no embrião seria decorrente da oxidação da glicose pela AR. Na segunda hipótese o sorbitol encontrado no embrião teria sua origem no endosperma, de onde seria constantemente translocado para subsequente metabolização pela AR. Somente parte do sorbitol eventualmente não metabolizado seria acumulado no embrião, explicando porque o acúmulo de sorbitol no embrião seja muito inferior à quantidade esperada se levássemos em conta a grande atividade de SDH do endosperma e a quantidade de sorbitol constantemente produzida.

O transporte de hexoses normalmente é realizado por meio de proteínas transportadoras (Koch, 2004). Portanto, se a segunda hipótese for verdadeira, provavelmente existe um transportador de sorbitol na semente de milho. Analisando os bancos de ESTs de milho foi possível encontrar um transcrito que codifica um possível

transportador de sorbitol (Tabela 6), que é aparentemente expresso apenas no endosperma. A baixa expressão do transportador de sorbitol é compatível com a idéia de que sua expressão está restrita a uma sub-região pequena do endosperma, provavelmente a que circunda o embrião. Resumidamente, a nossa hipótese consiste na frutose sendo convertida em sorbitol pela SDH, o sorbitol sendo translocado para o embrião pelo transportador de sorbitol, e no embrião, finalmente, o sorbitol seria reduzido em glicose pela AR, como mostra a Figura 35.

**Tabela 6.** Distribuição do EST do possível transportador de sorbitol em bibliotecas de cDNA de diferentes tecidos. Número normalizado de ESTs por biblioteca (x10.000).

Gene	Endosperma	Folha	Raiz	Pendão	Plântula	Embrião
Transportador de Sorbitol	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

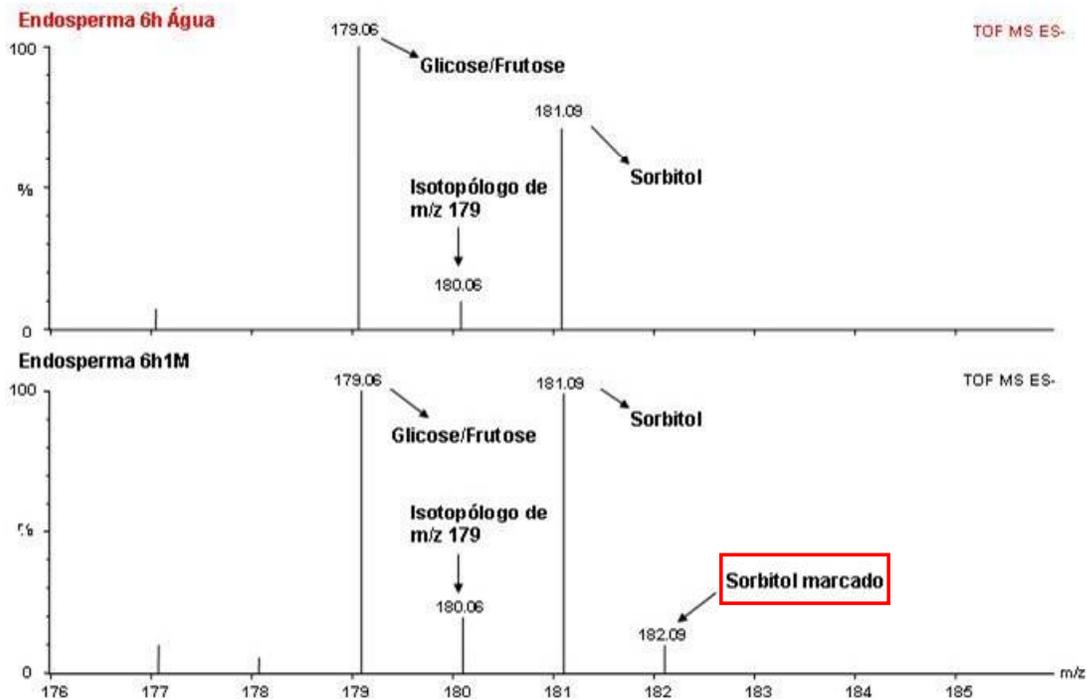


**Figura 35.** Esquema hipotético em sementes de milho da via do sorbitol, onde a frutose é reduzida em sorbitol pela SDH, o sorbitol é translocado para o embrião pelo transportador de sorbitol e convertido em glicose pela AR. A sacarose é translocada para a semente e convertida em frutose e posteriormente em amido em várias etapas.

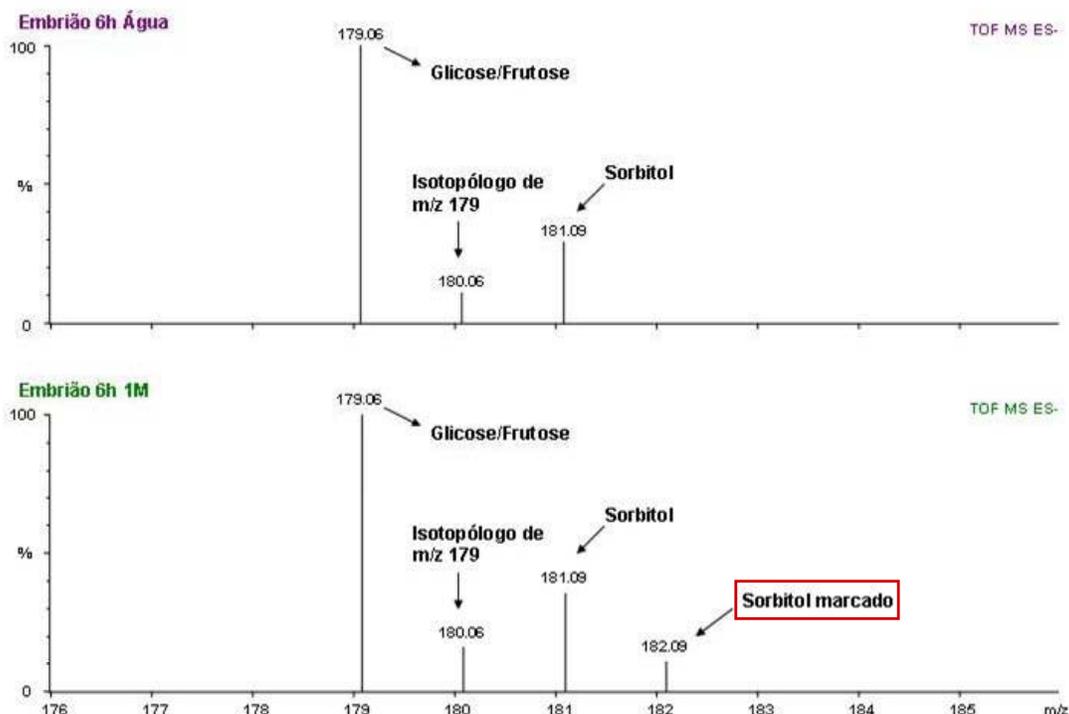
### 2.3. O sorbitol sintetizado no endosperma é transportado para o embrião

Para confirmar o transporte de sorbitol do endosperma até o embrião, sementes de milho foram injetadas na camada mais externa do endosperma com 10uL de solução 1M de sorbitol marcado com carbono 13 ou água, como controle. Após 6h as

sementes injetadas foram colhidas e o endosperma foi separado do embrião (que foi cuidadosamente lavado para retirar restos de endosperma). Estes órgãos foram então macerados e os açúcares foram extraídos com álcool 80%, depois liofilizados e lidos em espectrometria de massas. A Figura 36 mostra, como esperado, presença de sorbitol no endosperma injetado. A Figura 37 mostra que o extrato alcóolico de embrião também contém sorbitol marcado, comprovando, portanto, que houve transporte deste açúcar do endosperma para o embrião.



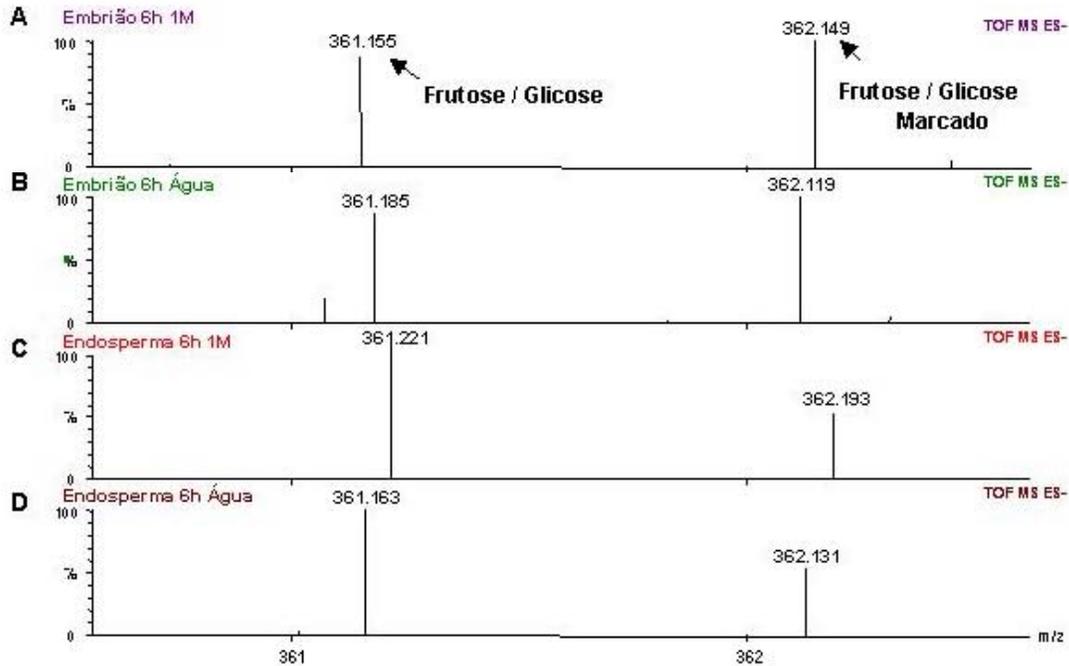
**Figura 36.** ESI-MS do endosperma após 6 horas da injeção na semente de milho. Acima espectro onde foi injetado água, como controle e abaixo espectro onde foi injetado  $^{13}\text{C}$  sorbitol. As setas indicam a massa do açúcar identificado. Em vermelho está indicada a massa do sorbitol marcado.



**Figura 37.** ESI-MS do embrião após 6 horas da injeção na semente de milho. Acima espectro onde foi injetado água, como controle e abaixo espectro onde foi injetado  $^{13}\text{C}$  sorbitol. As setas indicam a massa do açúcar identificado. Em vermelho está indicada a massa do sorbitol marcado.

Além disso, verifica-se (Figura 38) que o sorbitol marcado é quebrado em glicose e/ou frutose. Embora não tenha sido possível diferenciar o pico da glicose daquele da frutose, estes resultados parecem indicar que o sorbitol, chegando no embrião, é usado em processos subsequentes. Como o embrião não tem atividade SDH (que converteria sorbitol em frutose), o pico de hexose  $^{13}\text{C}$  corresponderia à glicose produzida via redução do sorbitol pela possível AR do embrião. Uma outra possibilidade seria o transporte para o embrião de  $^{13}\text{C}$ -frutose proveniente da oxidação do  $^{13}\text{C}$ -sorbitol no endosperma pela SDH. Entretanto, esta hipótese parece menos plausível, porque a quantidade de  $^{13}\text{C}$ -frutose/glicose é maior no embrião que no endosperma (Figura 38). Podemos observar na Figura 38 que existe frutose/glicose vindas do sorbitol marcadas no embrião e endosperma onde foi injetada água, este fato não é estranho, pois encontramos açúcares marcados naturalmente. Observamos na Figura 38 que a intensidade relativa dos açúcares marcados é a mesma para os

embriões e endospermas injetados com água e com sorbitol marcado. Isto ocorre porque a área visualizada corresponde a 100% do valor do íon com maior m/z, no caso frutose/glicose, porém a intensidade nominal do embrião e endosperma injetados com sorbitol marcado são maiores do que nos injetados com água.

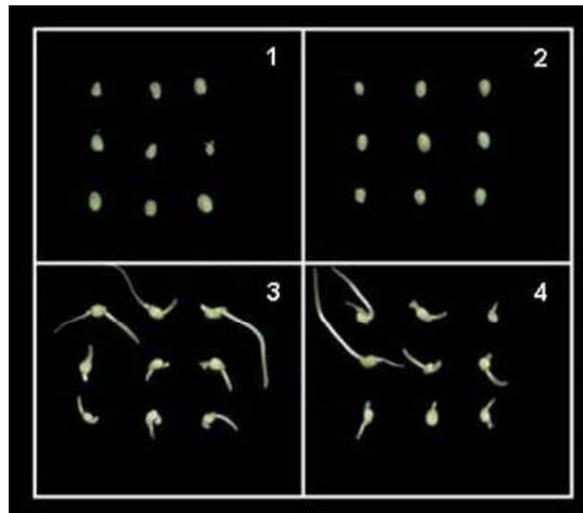


**Figura 38.** ESI-MS do embrião (A e B) e endosperma (C e D) após 6 horas da injeção na semente de milho. B e D, espectro onde foi injetado água, como controle; e A e C espectro onde foi injetado  $^{13}\text{C}$  sorbitol. As setas indicam a massa do açúcar identificado.

#### 2.4. O embrião sobrevive tendo o sorbitol como única fonte de carbono?

Embora existam diversas publicações em relação ao transporte de carbono do floema para a base da semente, nada se sabe sobre o transporte entre o endosperma e o embrião (Rolletschek *et al.*, 2005). O embrião está distante da região de transferência da semente e não existe sistema vascular conectando o pedicelo da semente ao embrião. Os nossos dados preliminares sugerem que o sorbitol é um dos açúcares translocados para o embrião. Este cenário parece bastante interessante se considerarmos que o endosperma, devido à intensa síntese de amido em curso, compete com o embrião pelo açúcar que entra na semente. Numa situação destas, a síntese de sorbitol seria uma alternativa eficaz para que parte do carbono ingressante

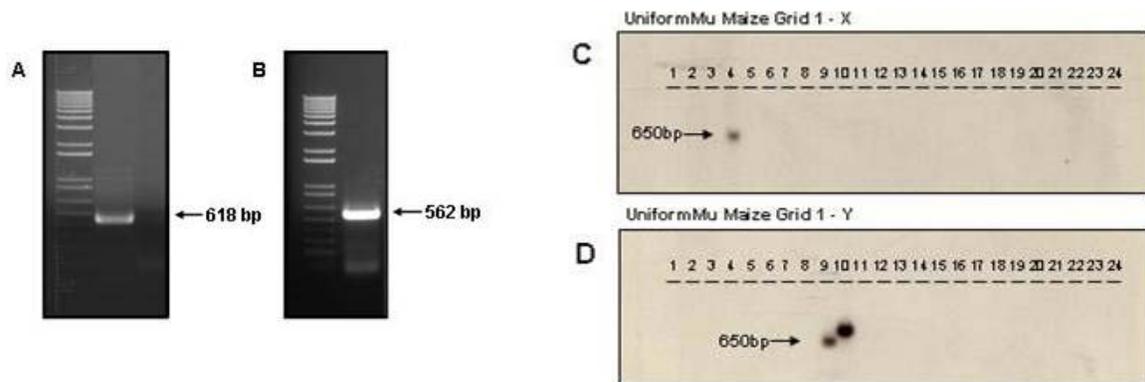
na semente escapasse à maquinaria de síntese de amido do endosperma (uma vez que o endosperma não tem atividade AR para metabolizar o sorbitol) e poderia ser transportada para suprir as necessidades do embrião em desenvolvimento. Se este fato for verdadeiro, espera-se que o embrião, em condições extremas, possa sobreviver tendo como única fonte de carbono o sorbitol. Para testar esta hipótese, embriões de 14 DAP de milho foram colocados em meio contendo sacarose, sorbitol ou manitol como únicas fontes de carbono. Como mostra a Figura 39, o embrião apresenta crescimento comparável tanto em sacarose como em sorbitol, mas não em manitol. Corroborando nossos resultados, mas apontando também para uma função do sorbitol na diferenciação celular embrionária, Swedlund e Locy (1993) observaram que o crescimento dos calos em sorbitol foi diferente do que o observado com outras fontes de carbono, tendo o sorbitol propiciado o crescimento de apenas calos embriogênicos e sendo que os calos crescidos em sorbitol tiveram uma maior capacidade de regeneração do que os crescidos em sacarose.



**Figura 39.** Embriões de milho com 14 DAP crescidos com sais MS (4,5 g/l) em todos os tratamentos por 7 dias. 1 – Sais MS, 2 – 87,65 mM manitol, 3 - 87,65 mM sacarose e 4 - 87,65 mM sorbitol.

## 2.5. Qual a importância da síntese de sorbitol no endosperma para o desenvolvimento do embrião?

Como mostra a Figura 39 o embrião também apresenta bom desenvolvimento tendo a sacarose como única fonte de carbono. Carey *et al.* (1982) comprovaram que o embrião também acumula sacarose ao longo do desenvolvimento. É de se perguntar, portanto, se o sorbitol não seria apenas uma alternativa secundária à sacarose para o desenvolvimento do embrião. Para averiguar esta possibilidade, um mutante da SDH foi isolado do banco de mutantes de milho *UniformMu* (McCarty *et al.*, 2005) (Figura 40), em colaboração com a Dra. Karen Koch (*University of Florida*). Como mostra a Figura 41, o mutante para o gene *SDH* é letal para a semente, indicando que a SDH e a correspondente síntese de sorbitol desempenham papel crucial no desenvolvimento da semente. O possível inserto do gene da SDH parece estar 100 pb acima do sítio de início da tradução, isto pode contribuir para a variação dos graus fenotípicos.



**Figura 40.** *Screening* dos mutantes SDH da população *UniformMu*. Foram amplificadas bandas únicas da SDH de milho com primers específicos para a região 5' (A) e 3' (B) do gene. Ambos os primers foram usados em conjunto com primers específicos Mu para a busca no *UniformMu Reverse Genetics Grids* dos insertos Mu no gene da SDH. Possível inserto Mu na SDH do *UniformMu Maize Reverse Genetics Grid 1* (C e D). A banda adicional observada na figura D, que não está indicada pela seta, é provavelmente devido ao uso rotineiro do PCR neste eixo para busca de outros insertos. Três plantas desta família apresentaram fenótipo marcante na semente que variam na severidade da deformação do endosperma e embrião em uma única espiga.



**Figura 41.** Fenótipo da semente de milho da família *UniformMu* carregando o possível inserto Mu inserido no gene da SDH. As sementes selvagens são cheias (ambas bronze e amarela) e estão entremeadas com sementes mutantes que variam de quase normais a sementes com pericarpo vazio, tendo pouco desenvolvimento do endosperma ou embrião.

O efeito do mutante SDH é tão drástico que não parece ser unicamente devido à falta de sorbitol como fonte de carbono para o embrião, principalmente se levarmos em conta que a sacarose também é translocada para o embrião e que o embrião sobrevive tendo como única fonte de carbono a sacarose. Portanto, deve haver uma outra causa para o fenótipo letal verificado. O endosperma não é um tecido fotossintético e não há sistema vascular de transporte, sendo assim um ambiente pobre em oxigênio. Nestas condições, a síntese de amido pode levar a um aumento de NADH, pela metabolização da sacarose, que acaba por ser tóxico para a semente (Rolletschek *et al.*, 2005). Uma vez que a síntese de sorbitol consome NADH, auxiliaria na detoxificação da semente. Se este fato for verdadeiro, é esperado que quanto maior a quantidade de sacarose que ingressa na semente, maior seja a necessidade de detoxificação do NADH e portanto, maior a atividade da SDH necessária. Como apresentado no Capítulo II desta tese, o raciocínio acima parece estar de acordo com o aumento de expressão do gene *SDH* verificado sob estímulo da sacarose e hipoxia.

- 1) SDH é um dos transcritos mais abundantes na biblioteca de endosperma no início do desenvolvimento (10 DAP).
- 2) A expressão da SDH tem seu pico aos 15 DAP caindo a níveis baixos aos 25 DAP.
- 3) A SDH é expressa preferencialmente no endosperma, mais especificamente na região basal do endosperma amiláceo. Nos mutantes *sugary1* e *shrunk2* a atividade da SDH e a transcrição do gene *SDH* é maior do que nas sementes selvagens.
- 5) A transcrição do gene *SDH* é induzida por sacarose e hipoxia.
- 6) O gene da *SDH* de milho é dividido em três exons e dois introns, sendo que ocorre uma perda de introns durante a evolução das plantas.
- 7) O intron 1 da *SDH* contém elementos regulatórios que controlam a intensidade da transcrição.
- 8) O sorbitol pode ser transportado do endosperma para o embrião na semente de milho.
- 9) Foi encontrada a expressão de uma aldose redutase no embrião de milho e ESTs de um possível transportador de sorbitol no endosperma.
- 10) O sorbitol pode ser translocado do endosperma para o embrião pelo transportador de sorbitol e ser convertido em glicose pela aldose redutase no interior do embrião.
- 11) Os embriões de milho conseguem se desenvolver tendo como única fonte de carbono o sorbitol.
- 12) A inativação do gene *SDH* é letal para a semente de milho.

O metabolismo de amido e proteínas de reserva de milho vem sendo estudado há muito tempo e os primeiros genes relacionados a estas vias foram identificados por meio de estudos com mutantes. Muito foi descrito sobre a fisiologia e genética da semente de milho, porém alguns processos ainda permanecem desconhecidos, principalmente os relacionados à nutrição do embrião.

O metabolismo do sorbitol, ligado ao fluxo de carbono e por sua relação com a diabetes, tem sido amplamente estudado, porém em milho, sua função permanece indefinida. A presença do sorbitol no endosperma e embrião de milho foi descrita por Carey *et al.* (1982). Shaw e Dickinson (1984), demonstraram por meio de experimentos com carbono marcado que o sorbitol não é translocado das folhas para a semente e nem é acumulado. A sorbitol desidrogenase (SDH) de sementes de milho, que é capaz de metabolizar frutose em sorbitol e sorbitol em frutose, foi primeiro caracterizada bioquimicamente por Doehlert (1987a). Doehlert *et al.* (1988) sugeriram que o sorbitol poderia ser um intermediário na biossíntese de amido, servindo como substrato para síntese de glicose via uma enzima tipo aldose redutase (AR). Todavia, até agora, nenhuma atividade de AR pôde ser detectada no endosperma de milho, ficando o destino do sorbitol incógnito neste tecido.

O metabolismo do sorbitol em milho permaneceu esquecido por muito tempo, até que por meio de análises feitas no banco de dados MAIZEST verificamos que aos 10 DAP a SDH foi o EST que apresentou o maior número de transcritos, segundo estimado pelo número de *reads* no banco de dados. Os resultados apresentados no Capítulo I desta tese mostram que é possível que o endosperma sintetize uma grande quantidade de sorbitol e despertaram o questionamento sobre qual seria o papel do sorbitol na semente de milho.

Dispondo de um banco de ESTs de endosperma e de outros bancos públicos de ESTs de milho, encontramos o gene da AR expresso no embrião de milho. A SDH não é expressa neste tecido, portanto, a AR não teria o sorbitol como substrato no embrião, a não ser que o sorbitol fosse translocado do endosperma para o embrião. Carey *et al.* (1982) já haviam identificado quantidades crescentes de sorbitol no embrião em

desenvolvimento. Considerando que o sorbitol encontrado no embrião teria que ser transportado do endosperma para o embrião procuramos e encontramos um transportador de sorbitol no endosperma de milho, por meio de análises nos bancos de ESTs de milho.

Por meio de experimentos com sorbitol marcado com carbono 13, comprovamos o transporte do sorbitol do endosperma para o embrião. Além disso, os dados parecem indicar que o sorbitol marcado, chegando ao embrião, é convertido em glicose, via redução do sorbitol pela AR embrionária.

Embora existam diversas publicações em relação ao transporte de carbono do floema para a base da semente, nada se sabe sobre o transporte entre o endosperma e o embrião (Rolletschek *et al.*, 2005). O embrião está distante da região de transferência da semente e não existe sistema vascular conectando o pedicelo da semente ao embrião. Os dados mostrados no capítulo III sugerem que o sorbitol é um dos açúcares translocados para o embrião. Este cenário pareceu bastante interessante considerando que o endosperma, devido à intensa síntese de amido em curso, compete com o embrião pelo açúcar que entra na semente. Numa situação destas, a síntese de sorbitol seria uma alternativa eficaz para que parte do carbono ingressante na semente escapasse à maquinaria de síntese de amido do endosperma (uma vez que o endosperma não tem atividade AR para metabolizar o sorbitol) e poderia ser transportado para suprir as necessidades do embrião em desenvolvimento. Através de experimentos de cultura *in vitro*, comprovamos que o embrião imaturo de milho consegue sobreviver tendo o sorbitol como única fonte de carbono, indicando que o embrião, de fato, consegue metabolizar o sorbitol e usá-lo subsequenteemente como forma de energia.

Além disso, isolamos um mutante de SDH para verificar se o sorbitol não seria apenas uma alternativa secundária à sacarose para o desenvolvimento do embrião. O mutante para o gene da *SDH* mostrou ser letal para a semente, indicando que a SDH e a correspondente síntese de sorbitol desempenham importante papel no desenvolvimento da semente.

O efeito do mutante SDH se mostrou tão drástico que não parece ser devido unicamente à falta de sorbitol como fonte de carbono para o embrião. Aliás, a sacarose também é translocada para o embrião e o embrião também sobrevive tendo a sacarose

como única fonte de carbono. Portanto, como explicar o fenótipo letal verificado no mutante *sdh/sdh*? Considerando que o endosperma é um ambiente pobre em oxigênio, a metabolização da sacarose para síntese de amido certamente leva a um aumento considerável de NADH, que pode chegar a ser tóxico para a semente (Rolletschek *et al.*, 2005). Uma vez que a síntese de sorbitol consome NADH e recupera NAD, auxiliaria na detoxificação da semente. Se este raciocínio é verdadeiro, espera-se que quanto maior a quantidade de sacarose que entra na semente, maior seja a necessidade de detoxificação do NADH. Ensaio de *Northern blot*, atividade enzimática e expressão transiente, descritos no Capítulo II, permitiram demonstrar que a transcrição do gene *SDH* é induzida pela sacarose e hipoxia, corroborando a hipótese acima.

Portanto, podemos sugerir a partir destes resultados que o fluxo de carbono do endosperma para o embrião se dá da seguinte maneira: a sacarose chegando no endosperma é clivada em frutose, que por sua vez pode ser reduzida a sorbitol pela SDH, numa reação que recupera NAD e auxilia na manutenção do equilíbrio NADH/NAD no endosperma. O sorbitol, por sua vez, é transportado através de um possível transportador de sorbitol para dentro do embrião. Uma vez no embrião, o sorbitol é metabolizado em glicose por uma aldose redutase, sendo desta forma, utilizado como fonte de carbono.

Os resultados apresentados nesta tese mostram um mecanismo inédito de interação metabólica entre o embrião e o endosperma, mediado pelo sorbitol, cuja síntese na semente, até então, era tida como um caminho “sem saída”.

- 1) Caracterizar o mutante *SDH* por meio de caracterização anatômica e fisiológica das sementes mutantes *sdh/sdh* e *SDH/sdh* ao longo do desenvolvimento.
- 2) Investigar a translocação de sorbitol do endosperma para o embrião em tempo real por meio de micro-injeção de  $^{13}\text{C}$  sorbitol marcado nas sementes de milho em desenvolvimento, acompanhando o fluxo através das sub-regiões da semente (Rolletschek *et al.*, 2005).
- 3) Caracterizar o possível transportador de sorbitol expresso na semente de milho, quantificando sua expressão em diferentes regiões da semente por RQ-PCR (PCR em tempo real) e localizando os mRNAs por hibridização *in situ*. Testar funcionalmente o transportador de sorbitol, por meio de expressão heteróloga em levedura e testes de internalização de sorbitol marcado (Weschke *et al.*, 2000).
- 4) Caracterizar a aldose redutase na semente de milho do mesmo modo descrito para o transportador de sorbitol, expressar o gene da AR em sistema heterólogo e iniciar a caracterização bioquímica da proteína recombinante
- 5) Investigar os elementos regulatórios do intron 1 por meio de ensaios de transformação transiente e permanente.

As técnicas rotineiras de Biologia Molecular empregadas neste projeto estão descritas nos seguintes manuais de laboratório: Sambrook *et al.*, 1989; Gelvin *et al.*, 1993; Coligan *et al.*, 1997 e Ausubel *et al.*, 1997.

### 1. Material vegetal

Foram utilizadas nos experimentos plantas de milho (*Zea mays L.*) cultivadas em casa de vegetação sob condições de iluminação (14 horas de claro) e irrigação controladas. Foram cultivadas as linhagens F352, A188, BR400 (shrunken2), BR402 (sugary1) e BR102 (normal). As plantas foram coletadas com 10, 15, 20 e 25 DAP e diferentes tratamentos e mantidas em  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso.

Sementes de milho foram submersas por 24 horas em água estéril e colocadas por cinco minutos em álcool 70%, posteriormente submersas por 30 minutos em hipoclorito de sódio 50% e lavadas por seis vezes com água estéril. Estas sementes foram colocadas em papel de germinação e mantidas por três dias em câmara de germinação com temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  no escuro e quando foram utilizadas plântulas, esta foram mantidas por mais quatro dias sob iluminação controlada com 16 horas de claro. As plântulas foram coletadas, tendo suas partes congeladas separadamente em nitrogênio líquido.

### 2. Determinação *in silico* da expressão dos genes

Para determinação do número de *reads* nos diferentes dias após a polinização do endosperma de milho foi realizado 'tblastn' das seqüências selecionadas contra o banco do MAIZEST (<https://maizest.unicamp.br>). Após a escolha do melhor *cluster*, foi feita uma rotina em SQL - *Generic Database Query* (select library.code, count(\*) from *reads\_cluster* , *reads*, *plate*, *library*, *clusters* where clusters.name = 'MZCCL10001G12.g' AND *reads\_cluster*.cluster\_id = clusters.id AND *reads\_cluster*.reads\_id = *reads*.id AND *reads*.plate\_id = plate.id AND plate.lib\_code = library.code group by library.code) para determinação do número de *reads* nas diferentes bibliotecas.

Para determinar o número de ESTs no banco de dados de diferentes tecidos foi realizado *Northern blot* virtual no banco de dados MAIZEST ([www.maizest.unicamp.br](http://www.maizest.unicamp.br)).

### **3. Northern blot**

Foram coletadas sementes de milho das linhagens cultivadas com 10, 15, 20, 25 DAP e diferentes tratamentos das quais foi extraído o RNA total pelo método de cloreto de lítio (Manning, 1991 com modificações). Foram coletados folhas, caules e raízes de plântulas com sete dias após a germinação e inflorescência e espiguetas de plantas adultas F352. O RNA total foi extraído com Trizol®, seguindo as orientações do fabricante (Invitrogen).

A quantificação da concentração do RNA foi realizada por espectrofotometria (GeneQuant da Pharmacia Biotech).

A análise de *Northern blot* foi realizada a partir de uma eletroforese com 12 µg de RNA total em gel de 1% agarose por 6 horas a 50 volts em tampão MOPS desnaturante (5% de formaldeído). O RNA foi então transferido para membranas de Nylon Hybond™-N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech) durante 12 horas em tampão de transferência SSC 10X. A sonda foi obtida a partir da digestão com *Eco* RI e *Bam*H I dos clones do MAIZEST (SDH – MZCCS15044A12, Sacarose sintase – MZCCL20013D04 e 27 kDa gama zeína – MZCCL10001G10). As membranas foram pré-hibridadas por 4 horas em solução 5X SSC, 5X Denhardt's, 1X SDS e 50% de formamida, 50 mM fosfato de sódio pH 6.8, 1% SDS e 100 µg de DNA de esperma de salmão. Em seguida foi adicionada a sonda, previamente desnaturada por 5 min a 96 °C, à solução de hibridação (5X SSC, 1X SDS e 50% de formamida, 20 mM fosfato de sódio pH 6.8, 1% SDS e 5% de sulfato de dextran) que foi realizada por 12 horas a 42 °C. As membranas foram lavadas uma vez a temperatura ambiente e duas vezes a 65 °C em solução de 0,1% de SDS e 1,0% de SSC e expostas à radiografia empregando o filme Kodak MGX/Plus à -70 °C. Os filmes foram revelados automaticamente no equipamento Macrotec MX-2.

### **4. Análise filogenéticas**

As seqüências protéicas foram alinhadas com o programa CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997). A seqüência de aminoácidos foi analisado pelo método neighbor-joining (Saitou e Nei, 1987) utilizando o programa NEIGHBOR (PHYLIP,

Phylogeny Inference Package version 3.57c; Felsenstein, 1993) e distâncias PAM (Dayhoff *et al.*, 1978), obtidas com o programa PRODIST (PHYLIP). O Bootstrap na análise neighbor-joining foi feita com o programa SEQBOOT (PHYLIP). As árvores foram visualizadas com o programa TREEVIEW (Page, 1996).

## **5. Atividade enzimática**

Foi feita a extração de proteína total de raiz, folha e caule de plântulas de milho, semente inteira, endosperma e embrião de plantas adultas e embrião somático de milho com o tampão de extração com 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) contendo 5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 mM DTT, na proporção de 0,2 g de peso fresco/ml de tampão. O material foi macerado no próprio tampão e em seguida, homogeneizado e centrifugado por 15 minutos a 4 °C e 14.000 rpm. Foi coletado o sobrenadante e foram preparadas alíquotas com a mistura de 10 µg de proteína total em 10 µL da extração e de 5 µL de tampão de amostra (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 20% glicerol; 0,025% de azul de bromofenol; 5% de β-mercaptoetanol). O material foi submetido à eletroforese a 4 °C, com uma corrente de 25 mA e 60 V por 12 horas em gel PAGE nativo 12%. Após a corrida, o gel foi incubado por 10 min a temperatura ambiente numa solução com 68 mM de sorbitol, 0,15 mM NAD (B-Nicotinamide adenine dinucleotide), 0,18 mM nitro blue tetrazolium, 0,06 mM phenazine methasulfate e 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 com agitação horizontal. Após este período foi fixado em uma solução aquosa 9% de ácido acético e 45% de metanol.

A atividade da SDH foi medida no espectrofotômetro seguindo a redução de NAD a NADH a 30 °C. Os ensaios de SDH continham 30 mM de sorbitol, 2 mM de NAD, 5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 100 mM de Tris-HCl, pH 9.0, em um volume final de 1 mL. Para os ensaios de cinética enzimática foram usados 10 mM de NAD e alteradas as concentrações de sorbitol, de 0 a 25 mM. A redução de NAD foi monitorada a 340 nm no espectrofotômetro DU-65 Beckman. Uma unidade enzimática foi definida como 1 nmol de NAD reduzido por minuto, por miligrama de proteína a 30 °C. A concentração protéica dos extratos foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando o reagente de ensaio protéico da Bio-Rad.

Para os ensaios de efeito da desfosforilação, a atividade da SDH foi feita no tampão de reação, contendo de 0-5 unidade de fosfatase alcalina ou na reação

contendo 5 unidades de fosfatase alcalina e de 0-40 mM de B-glicerol fosfato (inibidor de fosfatase alcalina). As reações controle sem fosfatase alcalina continham 40 mM de B-glicerol fosfato. Uma reação controle sem sorbitol foi feita em cada ensaio.

A análise estatística feita foi Anova de um critério com pós-teste LSD,  $p < 0,05$ .

## **6. Espectrometria de massas**

As bandas de gel foram cortadas em pequenos pedaços e secas com acetonitrila. Aos pedaços secos foi adicionado 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e solução de tripsina. A digestão foi feita durante à noite. O produto da digestão foi analisado com o nano-LC-MS/MS usando Q-ToF Ultima API (Micromass) acoplado com o CapLC liquid chromatograph, utilizando a coluna nanoease Symmetry C18 0.075 x 150 mm. O espectro MS/MS foi adquirido com todos os +2 e +3 e os dados finais foram processados utilizando Proteinlynx Global Server (Waters). Os dados processados foram pesquisados com o banco de dados NR usando o motor de pesquisa Mascot (Matrix Science Ltd).

## **7. Ensaio *in situ* de atividade enzimática**

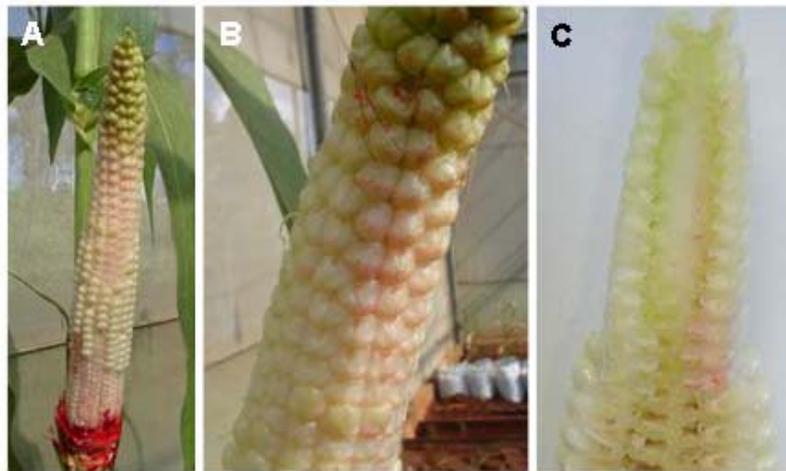
Foram feitos cortes longitudinais à mão com 2 mm de espessura de sementes de milho de 16 DAP. As sementes foram fixadas imediatamente (as primeiras gotas do fixador foram aplicadas na lâmina durante o corte) em 2% de paraformaldeído, 2% de poli-vinilpirrolidona 40 e 0,0001 M DTT, pH 7,0, a 4 °C por 1 hora. Após a fixação, os cortes foram lavados durante a noite em água a 4 °C, sendo a água trocada ao menos cinco vezes para retirada dos carboidratos (Sergeeva e Vreugdenhil, 2002).

Os cortes foram incubados por 10 min a 37 °C num tampão de reação com 68 mM de sorbitol, 0,15 mM NAD (B-Nicotinamide adenine dinucleotide), 0,18 mM nitro blue tetrazolium, 0,06 mM phenazine methasulfate e 50 mM Tris-HCl, pH 9,0 com agitação horizontal. Os controles foram feitos incubando na solução com ausência de sorbitol. A reação foi interrompida lavando os cortes duas vezes em água destilada, uma vez em solução aquosa 9% de ácido acético e 45% de metanol e depois fixados em FAA (50% etanol, 4% formaldeído e 5% ácido acético).

O material foi visualizado em lupa Stemi SV 11 da Zeiss e as fotografias tiradas com o programa KS 100 3.0 da Zeiss.

## 8. Método de injeção na espiga de milho

Uma seringa de 1 mL com 0,33 mm de diâmetro foi usada para injetar 5 ml de solução na base de espigas de milho com 14 DAP. Resultados preliminares com anilina vermelha demonstraram que a solução injetada demorou duas horas para atingir o ápice após a injeção (Figura 42). Os experimentos foram realizados entre 10 da manhã e 6 da tarde. Os tratamentos consistiram em injetar água, como controle, e 50, 100, 150 e 300 mM de sacarose. As sementes foram coletas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido após 8 horas, sendo 6 horas para transcrição do gene.



**Figura 42.** Método de injeção de açúcares na espiga de milho. A: Espiga injetada com corante após duas horas. B: Detalhe da espiga, sementes com corante após duas horas. C: Espiga cortada longitudinalmente, sementes coradas.

Foi medido o brix com refratômetro ATAGO 1T da seiva da base da espiga, usando padrões de concentração conhecida de sacarose. Esta medida foi realizada para estimar a concentração de sacarose translocada, uma vez que 90% do açúcar translocado para a espiga é sacarose.

## 9. Isolamento do promotor

Filtros de uma biblioteca genômica BAC de milho (Bacterial Artificial Chromosome) da Clemson University Genomics Institute (CUGI), com tamanho médio de inserto de 137 kb (Tamanho do genoma: 2500Mb) cobrindo 14 genomas equivalentes foram adquiridos (Tomkins *et al.*, 2002) com o intuito de selecionar os clones que tinham o gene que codifica a enzima sorbitol desidrogenase. Esta biblioteca

foi construída no sítio *Hind* III do pCUGI e contém 247680 clones (645 placas) (6 filtros por biblioteca).

A sonda de 1,2 kb para identificação dos clones foi obtida a partir da digestão do clones MZCCL10001G02 do MAIZEST com *Eco* RI e *Bam* HI. Os filtros foram pré-hibridizados em solução 5X Denhardt's, 100 mg mL<sup>-1</sup> de DNA de esperma de salmão desnaturado, 6X SSC and 0,5% SDS por 6 h a 65°C. As hibridizações foram feitas durante a noite a 65°C no mesma solução de pré-hibridização contendo a sonda marcada com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP. Os filtros foram lavados duas vezes em temperatura ambiente em 2X SSC e 0,1% SDS e uma vez a 65 °C por 20 min em 0,2X SSC e 0,1% SDS e expostas à radiografia empregando o filme Kodak MGX/Plus à -70 °C. Os filmes foram revelados automaticamente em equipamento Macrotec MX-2. Foram identificados 38 clones positivos, sendo que foram adquiridos cinco deles. Foi feita a confirmação dos cinco clones, por meio de digestão com *Hind* III e *Southern blot*, conforme descrito anteriormente. Foi escolhido o clone 0117G10 para seqüenciamento, por apresentar o sinal mais forte de hibridação com a sonda utilizada.

## **10. Biblioteca *Shotgun***

O DNA do clone BAC 0117G10 obtido por meio de extração de DNA com o Kit “Qiagen Plasmid Purification – Giga Prep” (Qiagen), a partir de 5 litros de cultura, seguindo as orientações do fabricante, foi sonificado e os fragmentos foram separados por tamanho em gel de agarose. Fragmentos com tamanho de 0,8 a 1,2 kb foram recuperados do gel de agarose e clonados com o kit TOPO *Shotgun* Subclonig Kit no vetor pCR-4Blunt-TOPO (Invitrogen Life technologies, Carlsbad, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen).

Os clones foram sequenciados como descrito por Verza, *et al* (2005). As seqüências obtidas foram submetidas no Genbank com os seguintes números de acesso: DQ191049 e DU132578 a DU133156.

As seqüências foram analisadas com o programa ‘PHRED’ (Ewing e Green, 1998) e montadas com CAP3 (Huang e Madan 1999) com os parâmetros padrões usados para a montagem de ESTs.

## 11. Análise computacional

As regiões não codificadoras: 5', 3' e íntrons nas seqüências genômicas foram identificadas utilizando o programa SIM4 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/sim4.html>; Florea *et al.*, 1998). O alinhamento múltiplo de seqüências genômicas visando identificar segmentos conservados foi realizado com o programa “Advanced PipMaker” (<http://bio.cse.psu.edu/pipmaker>; Schwartz *et al.*, 2000). Estas análises foram feitas com a colaboração de Renato Vicentini dos Santos, do laboratório de Genoma Funcional – CBMEG – UNICAMP.

## 12. Southern blot

O número de cópias do gene que codifica a enzima sorbitol desidrogenase foi determinado por meio de experimentos de hibridação de DNA (Hoykaas, 1988). O DNA genômico de milho foi extraído utilizando-se o tampão CTAB e posteriormente purificado em colunas Microcon 100 (Amicon), conforme as orientações do fabricante. Aproximadamente 10 µg de DNA genômico foram digeridos com as enzimas *Hind* III, *Bam*H I ou *Eco*R I por 16 horas a 37 °C, submetido à eletroforese em gel de 1,0% de agarose a 30V por 12 horas e transferido para membrana Hybond N seguindo as orientações do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech).

A sonda foi preparada a partir de 50 ng do inserto da digestão com *Bam*H I e *Eco* RI do clone MZCCS15044A12.g de aproximadamente 400pb, purificado com o kit S.N.A.P. (Invitrogen), que foi marcado com o isótopo [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP com o Kit “Read-to-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)” (Amersham Biosciences). Os nucleotídeos não incorporados na marcação foram removidos por meio de uma purificação em resina Sephadex G-50. A incorporação da radioatividade foi analisada em Cintilômetro DisplayUnit 1217 Rackbeta com alíquotas retiradas antes e depois da filtração.

As membranas foram pré-hibridadas por 4 horas em solução contendo 5X SSC; 5X Denhardt's; 200 mM Tris-HCl pH 7,5; 1% SDS; 50% de formamida e 1,0 µg/mL de DNA de esperma de salmão, previamente desnaturado por 5 min a 96 °C. Em seguida foi adicionada a sonda, previamente desnaturada por 5 min a 96 °C, e a hibridação foi realizada por 16 horas a 42 °C. As membranas foram lavadas uma vez a temperatura ambiente e duas vezes a 65 °C em solução de 0,1% de SDS e 1,0% de SSC e

expostas à radiografia empregando o filme Kodak MGX/Plus à -70 °C. Os filmes foram revelados automaticamente no equipamento Macrotec MX-2.

### **13. Plasmídeos empregados**

Foram feitas três construções utilizando a seqüência genômica da sorbitol desidrogenase que estão representados na Figura 24.

pRT35SGUS – Este plasmídeo foi usado como controle, sendo oriundo do pRT103 com o promotor 35S. Ao pRT103 foi acrescentado o gene *GUS* com os sítios *Nco* I e *Bam* HI.

pRT0,5SDHGUS – Este plasmídeo é oriundo do pRT103, sendo que foi retirado o promotor 35S, acrescentado o gene *GUS* com os sítios *Nco* I e *Bam* HI e 0,526 kb da região promotora da SDH do -1 ao -526 pb, clonado com os sítios *Hinc* II e *Nco* I.

pRT2,0SDHGUS – Este plasmídeo é oriundo do pRT103, sendo que foi retirado o promotor 35S, acrescentado o gene *GUS* com os sítios *Nco* I e *Bam* HI e 2,071 kb da região promotora da SDH do -1 ao -2071 pb, clonado com os sítios *Hinc* II e *Nco* I.

pRT3,6SDHGUS – Este plasmídeo é oriundo do pRT103, sendo que foi retirado o promotor 35S, acrescentado o gene *GUS* com os sítios *Nco* I e *Bam* HI e 2,071 kb da região promotora da SDH do -1 ao -2071 pb e mais a região +1 a +1525 pb, incluindo o primeiro exon, o primeiro intron e parte do segundo exon da SDH, clonado com os sítios *Hinc* II e *Nco* I.

### **14. Bombardeamento**

Foi usado nos ensaios de bombardeamento o canhão de hélio construído em série pelo EMBRAPA - Recurso Genéticos de Brasília (CENARGEM) (Aragão *et al.*, 1995). Em todos os ensaios foi empregada uma pressão de 1.200 psi de gás hélio e vácuo de 28 mm de Hg, seguindo as orientações básicas do fabricante. As sementes e coleóptiles foram transferidos para o meio MS antes dos disparos, tendo sido posicionados dentro da câmara de vácuo do canhão numa distância de 6 cm do disco de ruptura. Foram efetuados dois tiros por placa, com a inversão da posição do material em 180° dentro da câmara de bombardeamento entre cada disparo.

As micropartículas utilizadas no bombardeamento (10 mg de ouro) foram preparadas a partir de uma lavagem em água, uma vez em etanol 70% e por último, uma lavagem em etanol anidro. O material foi centrifugado por 30 seg a 5.000 rpm e ressuspensionado em 60  $\mu$ L de glicerol 50%. Na preparação o DNA e as micropartículas foram homogeneizados em vórtex por 5 min e nesse material foram adicionados simultaneamente 20  $\mu$ L de espermidina 0,1 M e 50  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$  2,5 M. A mistura continuou sendo homogeneizada por 3 min e depois permaneceu em repouso por mais 3 min. Em seguida o material foi centrifugado por 5 seg a 5.000 rpm, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado uma vez com 200  $\mu$ L de etanol 70% a 4 °C e duas vezes com 200  $\mu$ L de etanol anidro a 4 °C (Kemper *et al.*, 1996). As micropartículas foram então ressuspensionadas em 60  $\mu$ L de etanol anidro e 7  $\mu$ L dessa preparação foram depositados em cada tela de aço ou disco de “kapton”, que permaneceram secando por 3 minutos no vácuo.

Nos tratamentos para testar o controle da região regulatória por sacarose e hipoxia, os coleóptiles (três dias após a germinação) foram colocados em meio líquido com 4,2 g/L de sais MS, no controle, e nos tratamentos os sais MS foram suplementados com 50 mM de sacarose, 50 mM de frutose, 50 mM glicose, 8 minutos de hélio borbulhado no meio e 50 mM de sacarose com 8 minutos de hélio borbulhado no meio. Os coleóptiles foram mantidos por 6 horas no tratamento, transferidos para meio MS sólido para o bombardeamento e posteriormente o tratamento foi repetido e os coleóptiles foram mantidos a 25 °C no escuro por 24 horas.

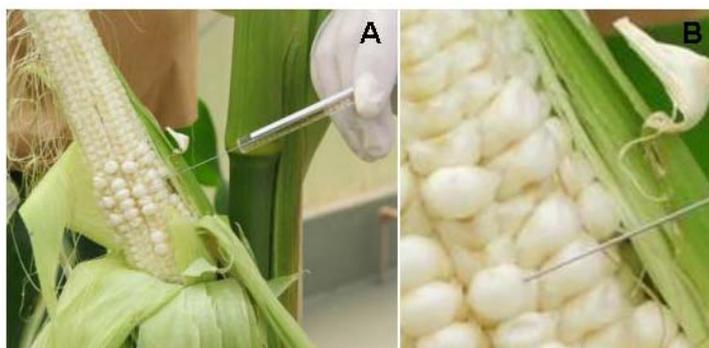
## **15. Análise histoquímica de GUS**

A atividade da proteína  $\beta$ -glucuronidase foi analisada histoquimicamente de acordo com Jefferson (1987). Vinte e quatro horas após os ensaios de bombardeamento as sementes e coleóptiles foram incubados em uma solução contendo 10 mg de X-Gluc dissolvido em 40 mL de tampão de revelação (50 mM fosfato de sódio pH 7.0; 10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 0,1% sarcosyl; 0,1% de Triton X-100; 5 mM ferrocianato potássio, 5 mM ferricianato potássio, 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e 20% de metanol) por 24 horas a 37 °C no escuro. Os tecidos foram observados em lupa Zeiss e fotografados com câmera digital.

As análises estatísticas utilizadas foram análise de homogeneidade de variância Bartlett e comparações múltiplas por Duncan,  $p < 0,05$ .

### **16. Método de injeção do sorbitol marcado na semente de milho**

Uma seringa Hamilton microliter 700 (Aldrich) de 10  $\mu\text{L}$  foi usada para injetar 10  $\mu\text{L}$  de solução na parte superior das sementes de milho com 14 DAP (Figura 43). Os experimentos foram realizados entre 10 h da manhã e 4 h da tarde. Os tratamentos consistiram em injetar água, como controle, e 1 M de sorbitol  $^{13}\text{C}$  marcado (Cambridge Isotope Laboratories, USA). As sementes foram coletas após 6 horas, o embrião foi separado do endosperma e lavado em água milliQ por 3 vezes. Os endospermas e os embriões foram congelados separadamente em nitrogênio líquido.



**Figura 43.** Método de injeção de  $^{13}\text{C}$  sorbitol. A: Injeção do sorbitol marcado na semente de milho. B: Detalhe da injeção na semente.

### **17. Extração dos açúcares**

Foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de etanol 80% fervendo nos tubos contendo os embriões e os endospermas de milho, as amostras foram maceradas e centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o procedimento foi repetido três vezes e o sobrenadante foi liofilizado (Shaw e Dickinson 1984).

### **18. Espectrometria de massa dos açúcares**

O espectro ESI-MS foi obtido em modo íon positivo em um espectrômetro de massa híbrido Q-TOF (Micromass, Manchester, U.K.). As seguintes condições padrões ESI-MS foram utilizadas: temperatura da fonte 100  $^{\circ}\text{C}$ , temperatura da retirada dos solventes 100  $^{\circ}\text{C}$ , voltagem de capilar 3.0 kV, e voltagem do cone 40 V. As amostras (250  $\mu\text{L}$ ) foram homogenizadas em um frasco contendo partes iguais de água e

acetonitrila, completando o volume final para 1,0 ml. Ácido fórmico (10 µL) foi adicionado à amostra para análise em ESI(+)-MS. As soluções foram injetadas com a taxa de fluxo de 5 µL/min utilizando uma bomba de seringa (Aparato Harvard), e o espectro de massas foi adquirido na faixa de 50-2000 m/z.

### **19. Germinação dos embriões zigóticos**

Embriões de milho com 14 DAP foram retirados da espiga e colocados por 5 dias no escuro em meio de cultura com sais MS 4,3 g/L e vitamina Gamborg 11,2 g/L, como controle e 87,65 mM de sacarose, 87,65 mM de sorbitol e 87,65 mM de manitol.

### **20. Produção e purificação da proteína AR recombinante**

Os fragmentos de DNA correspondentes a AR foram obtidos a partir de reações de PCR, tendo como molde clones das bibliotecas do MAIZEST. Os primers utilizados adicionaram aos produtos de PCR seqüências correspondentes aos sítios de restrição *Nde* I ou *Nco* I na extremidade 5' e *Bam* HI ou *Xho* I na extremidade 3' (5ARNdeNco – GCATATGGCCATGGCGCGGCACTTC, 3ARBamXho – GGGATCCTTACTCGAGTTCACCATCCCAGAGC). Os fragmentos amplificados, após digestão com as respectivas enzimas, foram inseridos no vetor pET28a (Novagen).

O fragmento de DNA correspondente à proteína AR foi clonado no vetor pET28a, e o plasmídeo, inserido na bactéria *E. coli* pRil. A linhagem pRil contém um plasmídeo que expressa tRNAs raros, correspondentes a códons de eucariotos, o que facilita o reconhecimento e a transcrição de genes eucariotos pela bactéria.

A expressão da AR foi induzida em 20 mL de meio LB suplementado com 100 mM de lactose, por três horas, após a DO<sub>600</sub> ter atingindo o valor de 0,6. Foram testadas as temperaturas de 25 e 37 °C e os tempos de 4, 6 e 12 horas e depois as amostras foram submetidas à análise por gel SDS-PAGE.

Para o teste de solubilidade, os pellets celulares foram ressuspensos em 500 µL de tampão de lise (50 mM fosfato de sódio pH 7.2, 5% glicerol, 100 mM de NaCl e 80 µg/mL de lisoenzima) As suspensões foram submetidas a dois ciclos de sonicação de 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C, e os sobrenadantes coletados em outro tubo.

As amostras foram incubadas em tampão de amostra de proteínas (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 8%, SDS 1%, β-mercaptoetanol 1%, EDTA 2 mM, azul de

bromofenol) a 100 °C por cinco minutos e submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 15%.

A primeira purificação foi feita em resina de níquel (Qiagen), eluindo-se em um gradiente de imidazol de 5 a 200 mM. As frações coletadas foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 15%. As frações de 50 a 100 mM de imidazol, foram dializadas em tampão 20 mM Tris-HCL, pH 7.5, 5 mM EDTA, 7 mM B-mercaptoetanol e 20 mM NaCl e purificadas em uma coluna de troca aniônica.

- 
- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., and Moreno, R.F. (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252: 1651-1656.
- Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro A.C.M., Ribeiro, G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C., Rech, E.L. (1995) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Ap. Gen.* 93:142-150.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1997). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc, USA.
- Barbosa, H.M., Glover, D.V. (1978). Genes and gene interactions affecting protein and lysine content in the endosperm of maize. *Braz. J. Genet.* 1:29-39.
- Bialeski, R.L. (1982). Sugar alcohols. *In Encyclopedia of Plant Physiology New series Vol 13<sup>A</sup>*. Edited by Loewus, F. and Tanner, W. pp. 158-192. Springer-Verlag, Berlin.
- Blakley, R.L. (1951). The metabolism and antiketogenic effects of sorbitol. Sorbitol dehydrogenase. *Biochem. J.* 49:257-271.
- Bommert, P. and Werr, W. (2001) Gene expression patterns in the maize caryopsis: clues to decisions in embryo and endosperm development. *Gene* 271: 131-142.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Carey, E.E., Dickinson, D.B., Wei, L.Y., Rhodes, A.M. (1982). Occurrence of sorbitol in *Zea mays*. *Phytochemistry*, 21: 1909-1911.
- Clancy M., Hannah, L.C. (2002). Splicing of the maize Sh1 first intron is essential for enhancement of gene expression, and a T-rich motif increases expression without affecting splicing. *Plant Physiol.* 130:918-929.
- Clark, J.K., Sheridan, W.F. (1988). Characterization of the two embryo-lethal defective kernel mutants *rg<sup>h</sup>\*-1210* and *fl<sup>\*</sup>-1253B*: Effects on embryo and gametophyte development. *Genetics* 120:279-290.
- Cho, S., Jin, S-W., Cohen, A., Ellis, R.E. (2004). A phylogeny of *Caenorhabditis* reveals frequent loss of introns during nematode evolution. *Genome Res* 14:1207-1220.
- Clayton, W.D. (1973). The species of Andropogoneae. *Kew. Bull.* 28:49-58
- Clayton, W.D. (1983). Notes on tribe andropogoneae (Gramineae). *Kew. Bull.* 35:813-8.
- Coleman, C.E. and Larkins, B.A. (1999) The prolamins of maize. In "Seed Proteins", eds. Shewry PR and Casey R, 109-139, Kluwer Academic Publishers.
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W., Wingfield, P.T. (1997). *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley.
- Cox, E.L., Dickinson, D.B. (1973). Hexoquinase from maize endosperm and scutellum. *Plant Physiol.* 51:960-966.
- Damerval, C., Guilloux, M.L. (1998). Characterization of novel proteins affected by o2 mutation and expressed during maize endosperm development. *Mol. Gen. Genet.* 257:354-361.

- Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M., Orcutt, B.C. (1978). In: Dayhoff, MO Eds. Atlas of protein sequence and structure, Vol 5, Suppl 3. National Biochemical Research Foundation, Silver Spring, MD, pp 345-352
- De Oliveira, D.E., Seurinck, J., Inze, D., Van Montagu, M., Botterman, J. (1990). Differential expression of five *Arabidopsis* genes encoding glycine-rich proteins. *Plant Cell* 2:427-436.
- Doehlert, D.C. (1987a). Ketose activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.* 84:830-834.
- Doehlert, D.C. (1987b). Substrate inhibition of maize endosperm sucrose synthase by fructose and its interaction with glucose inhibition. *Plant Science* 52:153-157.
- Doehlert, D.C., Felker, F.C. (1987). Characterization and distribution of invertase activity in developing maize (*Zea mays*) kernels. *Physiol Plantarum.* 70:51-57.
- Doehlert, D.C., Kuo, T.M., Felker, F.C. (1988). Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbreds of maize. *Plant Physiol.* 86:1013-1019.
- Doehlert, D.C., Kuo, T.M. (1990). Sugar metabolism in developing kernels of starch deficient endosperm mutants of maize. *Plant Physiol.* 92:990-994.
- Doehlert, D.C., Kuo, T.M. (1994). Gene expression in developing kernels of some endosperm mutants of maize. *Plant Cell Physiol.* 35: 411-418.
- FAO (2004) FAO Statistical Database: <http://apps.fao.org/>
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP (phylogeny inference package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington Seattle, WA
- Florea, L., Hartzell, G., Zhang, Z., Rubin, G.M., Miller, W. (1998). A computer program for aligning a cDNA sequence with a genomic DNA sequence. *Genome Res* 8:967-974.
- Freitas, F.A., Yunes, J.A., da Silva, M.J., Arruda, P., Leite, A. (1994) Structural characterization and promoter activity analysis of the  $\gamma$ -kafirin gene from sorghum. *Mol. Gen. Genet.* 245:177-186.
- Gelvin, S.B., Schilperrort, R.A., Verma, D.P.S. (1993). *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Giaquinta, R.T., Lin, W., Sadler, N.L., Franceschi, V.R. (1983). Pathway of phloem unloading of sucrose in corn roots. *Plant Physiol.* 72:362-367.
- Giroux, M.J., Hannah, L.C. (1994). Expression of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in shrunken2 and brittle2 mutants of maize. *Mol. Gen. Genet.* 431:400-408.
- Giroux, M.L., Boyer, C., Feix, G., Hannah, L.C. (1994). Coordinated transcriptional regulation of storage product genes in the maize endosperm. *Plant Physiol.* 106:713-722.
- Harris, J.I., Waters, M. (1976). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In: Boyer, P.D. (ed) *The enzymes*, vol. 13. Academic Press, NY, pp 1-49.
- Hooykaas, P.J. (1988). *Agrobacterium molecular genetics*. in *Plant Molecular Biology Manual* A4:1-13, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Hunter, B.G., Beatty, M.K., Singletary, G.W., Hamaker, B.R., Dilkes, B.P., Larkins, B.A., and Jung, R. (2002). Maize Opaque Endosperm Mutations Create Extensive Changes in Patterns of Gene Expression. *Plant Cell* 14: 2591-2612.
- Jefferson, R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol.* 5:387-405.

- Jeong, Y.M., Mun, J.H., Lee, I., Woo, J.C., Hong, C.B., Kim, S.G. (2006). Distinct roles of the first introns on the expression of *Arabidopsis* profiling gene family members. *Plant Physiol.* 140:196-209.
- Kemper, E.L., da Silva, M.J. and Arruda, P. (1996). Effect of microprojectile bomb. parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays L.*) embryos. *Plant Science* 121:85-93.
- Koch, K. E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev., Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47:509-540.
- Koch, K.E., Ying, Z., Wu, Y., Avigne, W.T. (2000). Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. *Journal of Exp. Bot.* 51:417-427.
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 7: 235-46.
- Lal, S.K., Lee, C., Sachs, M.M. (1998). Differential regulation of enolase during anaerobiosis in maize. *Plant Physiol.* 118:1285-1293.
- Lander, E.S., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (6822): 860-921.
- Lazzeri, E.L. and Shewry, P.R. (1993) Biotechnology of cereals. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 11:79-146.
- Lopes, M.A. and Larkins, B.A. (1993) Endosperm origin, development and function. *Plant Cell* 5:1383-1389.
- Luehrsen, K.R., Walbot, V. (1991). Intron enhancement of gene expression and the splicing efficiency of introns in maize cells. *Mol. Gen. Genet.* 225(1):81-93.
- Luque, T., Atrian, S., Danielsson, O., Jornvall, H, Gonzalez-Duarte, R. (1994). *Eur. J. Biochem.* 225:985-993.
- Luque, T., Hjelmqvist, L., Marfany, G., Danielsson, O., El-Ahmad, M., Persson, B., Jornvall, H., Gonzalez-Duarte, R. (1998). Sorbitol dehydrogenase of *Drosophila*. *The Journal of Biol. Chem.* 5: 34293-34301.
- Lur, H. S. and Setter, T.L. (1993) Role of auxin in maize endosperm development (timing of nuclear DNA endoreduplication, zein expression, and cytokinin). *Plant Physiol.* 103: 273-280.
- McCarty, D. R., A.M. Settles, M. Suzuki, B.C. Tan, S. Latshaw, T. Porch, K. Robin, J. Baier, W. T. Avigne, J. Lai, J. Messing, K. E. Koch, L. C. Hannah. (2005). Steady-state transposon mutagenesis in inbred maize. *Plant J.* 44: 52-61.
- Manning, K. (1991). Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation . *Analytical Biochemistry* 195: 45-50.
- Maret, W. Auld, D.S. (1998). Purification and characterization of human liver sorbitol dehydrogenase. *Biochemistry* 27:1622-1628.
- Marini, I., Bucchioni, L., Borella, P. Corso, A.D., Mura, U. (1997). Sorbitol dehydrogenase from bovine lens: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 340:383-391.
- Morita, A., Umemura, T., Kuroyanagi, M., Futsuhara, Y., Perata, P., Yamagushi, J. (1998). Functional dissection of a sugar-repressed alpha-amylase gene (Ramy1A) promoter in rice embryos. *FEBS lett* 423:81-85.

- Martin, C. and Smith, A.M. (1995) Starch biosynthesis. *Plant Cell* 7: 971-985.
- Morell, M., Copeland, L. (1985). *Plant Physiol.* 78:179.
- Motto, M., Hartings, H., Rossi, V. (2003). Gene discovery to improve the maize grain cell factory. *AgroGood industry hi-tech.* May/June:60-64.
- Nardone, J., Lee, D.U., Ansel, K.M., Rao, A. (2004). Bioinformatics for the 'bench biologist': how to find regulatory regions in genomic DNA. *Nature Immunology* 5:768-774.
- Ng, K., Ye, R., Wu, X.C., Wong, S.-L. (1992). Sorbitol dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 267: 24989-24994.
- Nolte, K.D., Koch, K.E. (1993). Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. *Plant Physiol.* 101:899-905.
- Nosarszewski, M., Clements, A.M., Downie, B., Archbold, D.D. (2004). Sorbitol dehydrogenase expression and activity during apple fruit set and early development. *Physiologia Plant.* 121: 391-398.
- Oh, S.J, Song, S.I., Kim, Y.S., Jang, H.J., Kim, S.Y., Kim, S.Y., Kim, M., Kim, Y.K., Nahm, B.H., Kim, J.K. (2005). *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiology* 138:341-351.
- Olsen, O.A. Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 16 Suppl: S214-27.
- Oura, Y., Yamada, K., Shiratake, K., Yamaki, S. (2000). Purification and characterization of a NAD<sup>+</sup>-dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit. *Phytochemistry* 54: 567-572.
- Page, R.D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12(4):357-358.
- Park, S.W., Song, K.J., Kim, M.Y., Hwang, J-H., Shin, Y.U., Kim, W-C., Chung, W-II. (2002). Molecular cloning and characterization of four cDNAs encoding the isoforms of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from the Fuji apple. *Plant Science* 162:513-519.
- Rolletschek, H., Koch, K., Wobus, U., Borisjuk, L. (2005). Positional cues for starch/lipid balance in maize kernels and resource partitioning to the embryo. *Plant J.* 42: 69-83.
- Roncarati, R., Salamini, F., Barterls, D. (1995). An aldose reductase homologous gene from barley: regulation and function. *The Plant Journal* 7(5):809-822.
- Rose, A.B. (2002). Requirements for intron-mediated enhancement of gene expression in *Arabidopsis*. *RNA* 8:1444-1453.
- Ruuska, S.A., Girke, T., Benning, C., Ohlrogge, J.B. (2002) Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling. *Plant Cell* 14:1191-1206.
- Russell, S.D. (1992) Double fertilization. *Int. Rev. Cytol.* 140:357-388.
- Sakai, H., Aoyama, T., Oka, A. (2000). *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant Journal* 24:703-711.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4):406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual.* 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sergeeva, L.I., Vreugdenhil, D. *In situ* staining of activities of enzymes involved in carbohydrate

- metabolism in plant tissues. *Journal of Exp. Bot.* 53: 361-370.
- Schwartz, S., Zhang, Z., Frazer, K.A., Smit, A., Riemer, c., Bouck, J., Gibbs, R., Hardison, R., Miller, W. (2000). Pipmaker- a web server for aligning two genomic DNA sequences. *Genome Res.* 10:577-586.
- Shaw, J.R., Dickinson, D.B. (1984). Studies of sugars and sorbitol in developing corn kernels. *Plant Physiol.* 75:207-211.
- Shewry, P.R. and Casey, R. (1999). *Seed Proteins.* Kluwer Academic Publisher.
- Swedlund, B., Locy, R.D. (1993). Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. *Plant Physiol.* 103:1339-1346.
- Tomkins, J.P., G. Davis, D. Main, N. Duru, T. Musket, J.L. Goicoechea, D.A. Frisch, E.H. Coe Jr., and R.A. Wing. 2002. Construction and characterization of a deep-coverage bacterial artificial chromosome library for maize. *Crop Science* 42:928-933.
- Thompson, J.D., Gibson T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882
- Tsai, C.Y., Salamini, F., Nelson, O.E. (1970). Enzymes of carbohydrate metabolism in the developing endosperm of maize. *Plant Physiol.* 46:299-306.
- Tsai, C.Y., Larkins, B.A., Gloce, D.V. (1978). Interaction of the *opaque-2* gene with starch-forming mutant genes on the synthesis of zein in maize endosperm. *Biochem. Genet.* 16:883-896.
- Touster, O., Shaw, D.R.D. (1962). Biochemistry of acyclic polyols. *Physiol. Rev.* 42:181-225.
- Verza, N.C., Silva, T. R., Cord Neto, G., Nogueira, F. T. S., deBrito P. H. F., de Rosa, V. E. J., Vettore, A.L., da Silva, F.R., Arruda A. (2005). Endosperm-preferred expression of maize genes as revealed by transcriptome - wide analysis of expressed sequence tags. *Plant Mol. Biol.* 59: 61-372.
- Weschke, W., Panitz, R., Sauer, N., Wang, Q., Neubohn, B., Weber, H, Wobus, U. (2000). Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant J.* 21(5): 455-467.
- Woo, Y.M., Hu, D.W.N., Larkins, B.A. and Jung, R. (2001) Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zeins gene expression. *Plant Cell* 13: 2297-2317.
- Yanagisawa, S., Schmidt, R.J. (1999). Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J.* 17:209-214,
- Yamaguchi, H., Kanayama, Y., Yamaki, S. (1994). Purification and properties of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit. *Plant Cell Physiol.* 35:887-892.
- Yamada, K., Oura, Y., Mori, H., Yamaki, S. (1998). Cloning of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit and gene expression. *Plant Cell Physiol.* 39: 1375-1379.
- Zeng, Y., Wu, Y., Avigne, W.T., Koch, K.E. (1998). Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional response. *Plant Physiol.* 116:1573-1583.