

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Juliana de Maria Felix

**“ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA ENVOLVIDA NO  
METABOLISMO DE SACAROSE EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum*  
*spp.*)”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do Título de Doutor em  
Genética e Biologia Molecular na área de  
Genética Vegetal e Melhoramento

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira  
Co-orientador: Dr. Eugênio César Ulian

Campinas – SP  
2006

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	
V	EX
TOMBO BC/	6864L
PROC.	16.12306
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	1,00
DATA	02/06/06

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F335a

Felix, Juliana de Maria

Análise da expressão gênica envolvida no metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) / Juliana de Maria Felix. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Marcelo Menossi Teixeira.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cana-de-açúcar. 2. Transdução de sinal celular. 3. Sacarose. 4. Expressão gênica. I. Teixeira, Marcelo Menossi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Expression profile of sugarcane (*Saccharum* spp.) sucrose pathway.

**Palavras-chave em inglês:** Sugarcane; Cellular signal transduction; Sucrose; Gene expression.

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

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

**Banca examinadora:** Marcelo Menossi Teixeira, Antonio Vargas de Oliveira Figueira, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Marcelo Carnier Dornelas, Marcos Silveira Buckeridge.

**Data da defesa:** 10/03/2006.

Data da defesa: 10 de Março de 2006.

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira (Orientador) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira (Titular) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (Titular) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas (Titular) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge (Titular) \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza (Suplente) \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Gláucia Mendes Souza (Suplente) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz (Suplente) \_\_\_\_\_

*When sugar dissolves, it spreads happiness*  
Dedico ao Pepê, meu açúcar diário, minha felicidade eterna

## PREFÁCIO

Minha trajetória no CBMEG começou há 7 anos atrás. Em março de 1999 eu conheci uma pessoa fantástica, que aprimorou ainda mais minha formação profissional e pessoal: Prof. Dr. Marcelo Menossi, o Mano. Apaixonado pelo trabalho e com uma paciência enorme, ele me apresentou um projeto de mestrado, que confesso, me renderam muitos frutos. E agora o de doutorado e pós doc, me deixando totalmente a vontade para me “auto-orientar” e ter a chance de orientar também. Mano, eu só tenho a agradecer pela confiança que você depositou em mim.

Não posso deixar de agradecer a uma pessoa excepcional, o Dr. Eugênio C. Ulian. Eugênio, você já deve estar cansado de tantos agradecimentos em teses ... mas realmente você merece. Não somente pelo trabalho que você tem em nos ajudar nas coletas, mas também no bom humor (sempre!), na prestatividade e sobretudo na amizade que você faz questão de cultivar (isso sem contar nas discussões de fisiologia, que sempre foram o máximo!). Você é um exemplo a seguir.

Agradeço também a todo o pessoal do Lab de Transdução de Sinal, coordenado pela Profa. Dra. Glaucia Mendes Souza, na USP. Todos vocês, em especial às Flávias, Ricardo e Glaucia, um muito obrigada por todas as discussões, hibridizações, viagens, RNAs, papers ...

Agradeço aos professores Dr. Gonçalo Guimarães Pereira e Dr. Michel Vincentz pelas discussões e sugestões valiosas durante a Pré-banca deste trabalho. E também aos professores Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira, Marcelo Carnier Dornelas e Marcos Silveira Buckeridge pela disposição em participar da banca examinadora. Um segundo obrigado ao prof. Dr. Marcelo Dornelas por me ajudar com tantas dúvidas da anatomia da cana e também das *in situs*.

Um obrigado muito grande para as super-secretárias: Sandra, Tânia e Andressa (do CBMEG), e Lourdes (da Pós) por todo o apoio para lidar com a papelada da defesa e com a burocracia e administração da reserva técnica.

Foram tantas as pessoas que passaram pelo nosso lab e de uma forma ou de outra sempre contribuíram na minha formação. Agradeço principalmente à San por ter me ouvido com tanto bom humor por todos esses anos; Paulino, Gerald, Fábio e Vicente por tantas

“discussões científicas” regadas a cerveja, Boi, Jorge, Marcelinho, Pedro; às meninas Layra e Edna que nos ajudam tanto no lab; aos pós-docs Tina, Edu, Renata e Vanuzia que estão sempre prontos a nos ajudar; aos novos Fabinho e Grazi. A todos, muuuiito obrigada pelas valiosas discussões (biológicas e pessoais), além da convivência muito saudável e divertida no lab. Melhor ainda pelas terapias de grupo e pelos happy hours ... E Syl, Mário e Dudu, a gente só tem a agradecer por vocês terem nos recebido tão bem no lab.

Às minhas co-orientadas Lucia, Ligia e Michelle. Obrigada pela amizade e por vocês terem me ensinado tanto.

Não posso deixar de falar que sem o apoio da minha família tudo seria muito diferente. Em especial minha “momm”, meu irmão Tchello, meu pai e Rosinha, obrigada pelo apoio e por nunca deixarem de acreditar em mim. Obrigada também aos Vicentini, minha segunda família, por seu grande afeto e amizade, em todos os momentos.

E Rê, você sempre esteve ao meu lado. Eu só tenho a agradecer por toda a ajuda (não somente profissional...), o companheirismo, o ombro, a paciência, o amor... e por me mostrar cada vez mais que a gente pode muito.

Agradeço a FAPESP, CNPq/PADCT e Capes pelo apoio financeiro nesses sete anos de pesquisa.

## ÍNDICE

---

<b>RESUMO</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xii</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1. Histórico e importância econômica da cana-de-açúcar	1
2. Metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar	3
3. A cana-de-açúcar como modelo: Projetos SUCEST e SUCAST	8
4. Tecnologia de <i>microarrays</i>	9
5. Estudo do transcriptoma da cana-de-açúcar	9
<b>OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>APRESENTAÇÃO DO TRABALHO</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>117</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>155</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>158</b>

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

---

### INTRODUÇÃO

**Figura 1.** Esquema das enzimas participantes da via metabólica de síntese de sacarose. \_ 5

### CAPÍTULO I

**Figure 1.** Differential expression consistency. \_\_\_\_\_ 43

**Figure 2.** Validation of microarray results using real-time PCR. \_\_\_\_\_ 44

### CAPÍTULO II

**Figure 1.** Sugar content throughout the growing season in the extreme individuals of a sugarcane segregated population. \_\_\_\_\_ 75

**Figure 2.** Expression levels of differentially expressed genes in sugarcane individuals. 76

**Figure 3.** Expression profiles of differentially expressed genes throughout the growing season. 77

**Figure 4.** Gene expression analysis in different tissues. \_\_\_\_\_ 78

### CAPÍTULO III

**Figura 1.** Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos. \_\_\_\_\_ 113

**Figura 2.** Clustering hierárquico dos genes diferencialmente expressos em entrenós em desenvolvimento em indivíduos segregantes para teor de açúcar. \_\_\_\_\_ 114

**Figura 3.** Diagrama de Venn para intersecção entre entrenós em desenvolvimento \_ 115

**Figura 4.** Validação por RNA blot dos genes diferencialmente expressos. \_\_\_\_\_ 116

### CAPÍTULO IV

**Figura 1.** Árvore filogenética de transportadores de sacarose em plantas construída pelo método de *neighbor-joining*. \_\_\_\_\_ 148

**Figura 2.** Árvore filogenética de transportadores de hexose em plantas construída pelo método de *neighbor-joining*. \_\_\_\_\_ 149

<b>Figura 3.</b> Análise de expressão de SAS de cana-de-açúcar codificantes para transportadores de mono e dissacarídeos. _____	150
<b>Figura 4a.</b> Análise de expressão comparativa entre amostras de alto e baixo teor de açúcar de SAS de cana-de-açúcar codificantes para transportadores de monosacarídeos. _____	151
<b>Figura 4b.</b> Análise de expressão comparativa entre amostras de alto e baixo teor de açúcar de SAS de cana-de-açúcar codificantes para transportadores de dissacarídeos. _____	152
<b>Figura 5.</b> Detecção de transcritos de transportadores de açúcar em entrenós imaturos de cana-de-açúcar. _____	153
<b>Figura 6.</b> Corte transversal de entrenó imaturo de cana-de-açúcar tratado com iodeto de potássio. _____	154

## ÍNDICE DE TABELAS

---

### CAPÍTULO I

<b>Table 1.</b> cDNA microarray hybridizations performed with sugarcane tissue samples. _	38
<b>Table 2.</b> The SUCAST Catalogue. _____	39
<b>Table 3.</b> Distribution of differentially expressed and ubiquitous genes among sugarcane tissue samples. _____	40
<b>Table 4.</b> SUCAST SASs showing differential expression among different sugarcane tissues.	41

### CAPÍTULO II

<b>Table 1.</b> Sugarcane genes showing differential expression between high and low sugar content populations. _____	73
---	----

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1.</b> ESTs de cana-de-açúcar que apresentaram padrão de expressão diferencial entre indivíduos de alto e baixo teor de sacarose em entrenós em desenvolvimento. _____	110
<b>Tabela 2.</b> ESTs de cana-de-açúcar a serem validados por Real Time PCR. _____	112

### CAPÍTULO IV

<b>Tabela 1.</b> Proteínas transportadoras de hexoses e sacarose identificadas por <i>datamining</i> no banco de dados do SUCEST. _____	147
---	-----

## RESUMO

---

Os processos associados ao acúmulo de sacarose e o metabolismo envolvido durante o crescimento e a maturação da cana-de-açúcar tem sido objeto de estudo intensivo. Uma estratégia para associar expressão gênica com uma característica desejada é comparar o perfil de expressão entre indivíduos pertencentes a uma população segregante para aquela determinada característica. Essa estratégia, denominada ‘genetical genomics’ foi utilizada nesse presente trabalho ao avaliar o perfil de expressão gênica de uma população de cana-de-açúcar que segrega para teor de sacarose. Para tal nós utilizamos cDNA microarrays que contém 1,280 elementos envolvidos em transdução de sinal, transcrição, desenvolvimento, ciclo celular, resposta à estresse e interação com patógenos, designado chip SUCAST (Sugarcane Signal Transduction). Com o objetivo de desvendar o envolvimento desses elementos no metabolismo de sacarose, foram comparados os perfis de expressão entre amostras de indivíduos de cana-de-açúcar de uma população segregante para teor de sacarose. Foram analisadas amostras de folha madura, sendo que 24 genes foram identificados como diferencialmente expressos. Também foram analisadas amostras de entrenós em desenvolvimento, sendo que 88 genes foram identificados como diferencialmente expressos em pelo menos uma amostra de entrenó analisada. Dada a complexidade genética da cana-de-açúcar, esta estratégia nos permitiu identificar genes candidatos que podem controlar vias metabólicas sinalizadas por açúcar envolvida na síntese e acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar. E finalmente, no trabalho descrito no capítulo 4 nós procuramos por genes codificantes para proteínas transportadoras de açúcar no banco de dados do SUCEST. A análise de seus diferentes padrões de expressão observado nesse trabalho sugerem seu possível envolvimento tanto em tecidos fonte quanto dreno, e também em diferentes estágios de desenvolvimento.

## ABSTRACT

---

Due to the capacity of sugarcane for storing high concentrations of sucrose in the culm, the processes associated with sucrose accumulation and metabolism during sugarcane growth and maturation have been the subject of intensive study. A strategy for associating gene expression with a trait is described in which individuals exhibiting particular traits are selected from segregating populations of sugarcane and their gene expression profiles compared. In this current work we used the ‘genetical genomics’ strategy on a sugarcane population segregating for sugar content. For this purpose we used cDNA microarrays that contains 1,280 components involved in several aspects of signal transduction, transcription, development, cell cycle, stress responses and pathogen interaction, that was designed Sugarcane Signal Transduction (SUCAST) chip. In order to assess the involvement of these elements in sucrose metabolism, the expression profiles of individuals from a sugarcane population segregated for sugar content were compared. In the work described at chapter 2 we analyzed mature leaf samples, and twenty-four genes were identified as differentially expressed. We also analyzed maturing internodes samples, and 88 genes were identified as differentially expressed at least in one internode sample. Given the complex genetics of sugarcane, this strategy could identify candidate genes that may control sugar-signaling pathways involved in sucrose synthesis and accumulation in sugarcane. And finally, in the last chapter we searched for genes encoding sugar transport proteins in the SUCEST database. The differential expression patterns of these putative transporter genes in sugarcane plants observed in this work suggest that they have many roles in both source and sink tissues, and at different developmental stages.

## INTRODUÇÃO

---

### ***1. Histórico e importância econômica da cana-de-açúcar***

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) faz parte de um complexo poliplóide pertencente à tribo Andropogoneae, da família Gramineae (Poaceae). As variedades atualmente cultivadas de cana-de-açúcar são resultado de hibridação interespecífica envolvendo as espécies *S. officinarum*, a qual contribui com o alto teor de açúcar e *S. spontaneum*, responsável pelo vigor vegetativo e resistência a estresses bióticos e abióticos (Ming et al, 2001). Devido a sua capacidade única de estocar sacarose em seus entrenós, a cana-de-açúcar tornou-se uma importante fonte de informação no que se diz respeito a síntese de sacarose, seu transporte e acúmulo. Os componentes da via metabólica de sacarose, bem como seus reguladores, tornaram-se potenciais alvos para o melhoramento dirigido das variedades de cana-de-açúcar (Moore, 2005).

A utilização de variedades melhoradas geneticamente constitui a principal estratégia para alcançar o aumento da produtividade. Devido à sua origem interespecífica, a cana-de-açúcar possui um dos mais complexos genomas vegetais, apresentando um variável nível de ploidia, dificultando a aplicação de técnicas convencionais no melhoramento genético da espécie. Apesar do mapeamento genético estar sendo realizado (Grivet e Arruda, 2001), a seleção por intercruzamento visando à obtenção de variedades de cana-de-açúcar mais produtivas, resistentes a pragas e doenças e adaptadas a ambientes diversos, é um processo bastante lento, cuja finalização pode levar de 12 a 15 anos. Esse processo pode ser efetivamente abreviado com o uso de marcadores moleculares, na seleção de características desejáveis, durante as fases iniciais do programa de melhoramento (Burnquist WL, 2000), tornando a cana-de-açúcar uma excelente candidata ao melhoramento por meio da engenharia genética. A identificação de genes responsáveis por qualidades agronomicamente desejáveis e sua posterior manipulação por meio de técnicas de biologia molecular podem proporcionar a obtenção de variedades bem sucedidas, reduzindo drasticamente as perdas na agricultura, além de permitir o aproveitamento de solos até então não utilizáveis. Além disso, devido aos altos níveis de similaridade genética entre gramíneas (Guimarães et al, 1997), os estudos realizados em cana-de-açúcar podem ser extrapolados para outras gramíneas cultivadas. No caso da cana-de-açúcar e de algumas outras

espécies vegetais, o projeto de seqüenciamento do genoma forneceu a base para o conhecimento mais detalhado da genética desses organismos.

Com isso, podemos acelerar o ritmo do melhoramento, identificando uma grande quantidade de novos genes que podem ser utilizados de forma dirigida para produzir variedades mais produtivas, melhor adaptadas a diferentes tipos de solo e clima e mais resistentes a pragas e doenças. Com isto, aumenta-se a produtividade e diminuem-se as perdas para o agricultor e para o país.

A cana-de-açúcar é uma das mais importantes espécies vegetais cultivadas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e sub-tropicais, com uma área maior que 20 milhões de hectares em 101 países (FAO 2005; <http://apps.fao.org>). O Brasil é o maior produtor, participando com 25% da produção. Desde os tempos do Brasil colônia até os dias atuais, a cultura de cana-de-açúcar tem sido uma grande fonte de riquezas para o nosso país, contribuindo para o seu crescimento. Neste começo do século XXI o Brasil se consolidou como o maior produtor mundial de açúcar de cana, produzindo 321,6 milhões de toneladas só na safra 2002/2003. Para a safra 2003/2004, houve um aumento de 6,9% na produção, resultando em 343,7 milhões de toneladas (Unica – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo). Cerca de 60% do açúcar produzido é destinado ao mercado externo.

A importância econômica desta cultura é grande, visto que é uma fonte de matéria-prima para a produção de açúcar, álcool e biomassa para a alimentação animal. Historicamente, a agroindústria da cana-de-açúcar imprimiu sua contribuição de forma marcante não apenas na economia do país, mas também nas áreas: 1) social - através da geração de empregos no campo e nas cidades, 2) estratégica – representando uma alternativa ao petróleo para a geração de energia e 3) ambiental – servindo de matéria-prima para a produção do álcool combustível, menos poluente do que a tradicional gasolina. O sucesso dessa cultura provém do crescente consumo de açúcar e álcool (etanol), sendo o estado de São Paulo responsável por 60% da safra brasileira (Pessoa-Jr et al, 2005).

Além do açúcar e do álcool, há uma variedade muito maior de produtos que podem ser obtidos a partir da cana-de-açúcar, como os plásticos biodegradáveis por exemplo. O bagaço da cana-de-açúcar é de grande interesse para o setor energético, podendo ser utilizado na co-geração de energia elétrica. As fibras podem ainda servir de matéria-prima para diversos produtos como papel, chapas aglomeradas, ração animal, etc. O emprego destes resíduos que anteriormente eram

descartados contribui para o desenvolvimento sustentável e para a geração de recursos do Brasil.

## ***2. Metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar***

A cana-de-açúcar, devido a sua capacidade de produzir e acumular sacarose, é uma das monocotiledôneas de maior importância econômica no mundo. O entrenó maduro pode acumular 12 - 16% de seu peso fresco e cerca de 50% de seu peso seco em sacarose (Bull e Glasziou, 1963, citado por Casu et al, 2003). Desta maneira, o aumento da concentração de sacarose em plantas de cana-de-açúcar vem sendo objeto de estudo há várias décadas. Porém, pouco se sabe sobre os determinantes fisiológicos e genéticos responsáveis pelo seu acúmulo. Apesar de haver diversos estudos que associam enzimas participantes do metabolismo de carboidrato e síntese de sacarose; são poucos aqueles que fizeram uma análise global da expressão gênica.

O metabolismo de carboidrato nas folhas sofre profundas alterações durante o desenvolvimento da planta. As folhas jovens são heterotróficas, pois dependem de carboidrato importado de outras regiões da planta. As folhas adultas, por outro lado, são autotróficas, ou seja, elas produzem fotoassimilados e atuam como a maior fonte de transporte de açúcar. Essa conversão de dreno para fonte acarreta em várias mudanças fisiológicas na folha, que podem ser responsáveis pela capacidade de acumular sacarose nos entrenós.

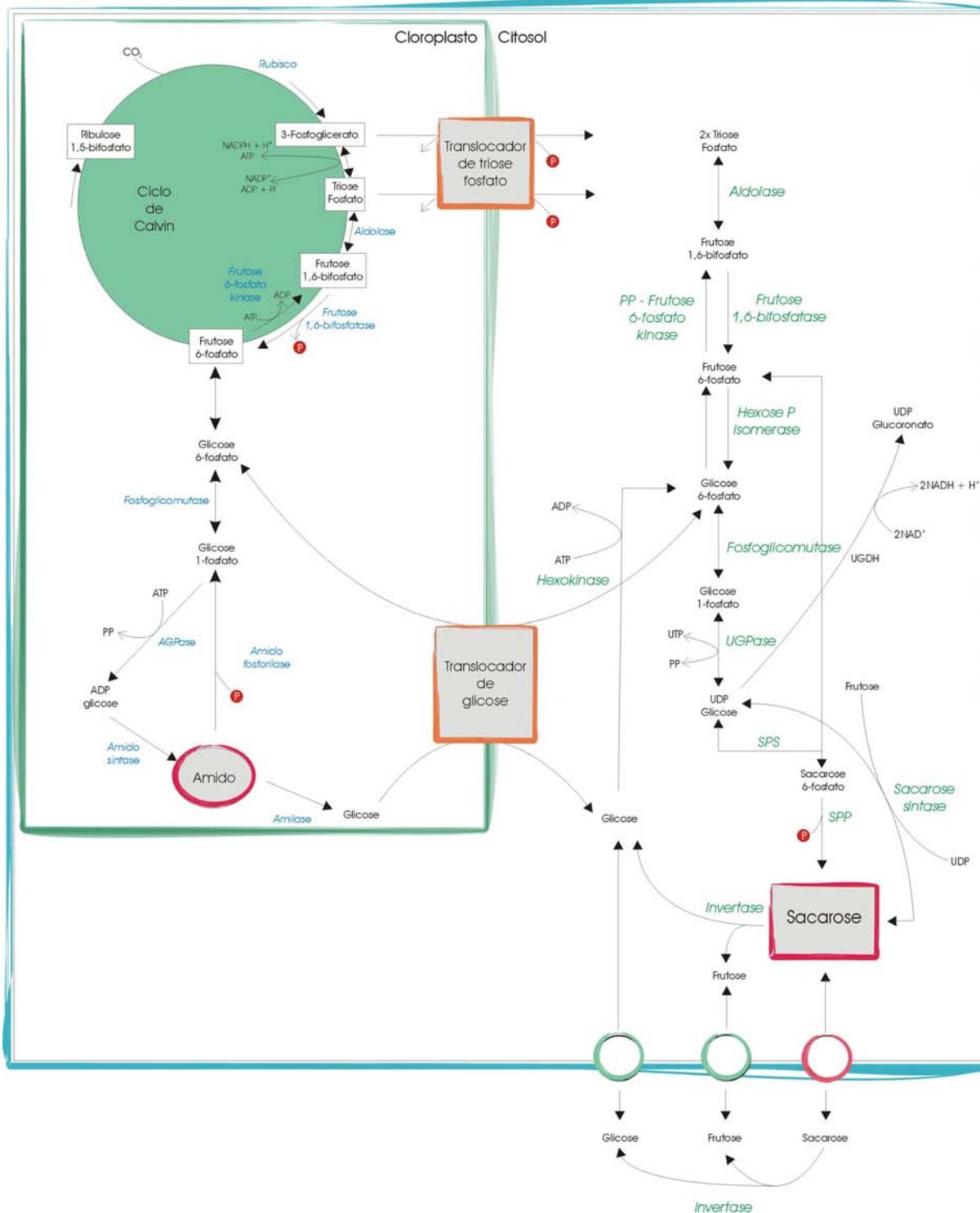
### *Síntese de sacarose em plantas C4*

Em 1950 pesquisadores do Havaí observaram um alto conteúdo de ácido málico e aspartático em folhas de cana-de-açúcar, em um período logo após a fotossíntese. Esse foi o primeiro passo para a posterior descoberta, em 1960 por Hatch e Slack, de plantas que possuem metabolismo C4. Sendo assim, a cana-de-açúcar fixa o CO<sub>2</sub> em um ácido orgânico de 4 carbonos (malato) nas células do mesófilo das folhas. O malato é então transportado para as células da bainha, onde é descarboxilado; o CO<sub>2</sub> liberado é fixado em sacarose via Ciclo de Calvin (Nelson 2000).

A via metabólica de síntese de sacarose em plantas C4 é praticamente a mesma para plantas C3, sendo que o modelo proposto por Glasziou e Gayler (1972) para o acúmulo de sacarose ainda é o que melhor descreve esse processo. Observa-se na Figura 1 o esquema dessa via e sua complexidade. A trioseP exportada para o cloroplasto é convertida para frutose-1,6-bifosfato (Fru1,6P2) pela enzima aldolase e subseqüentemente hidrolisada para frutose-6-fosfato (Fru6P) pela enzima citosólica frutose-1,6-bifosfatase (F1,6BPase). Este último passo, irreversível, é

considerado como sendo um importante ponto de controle nesta via (Lunn e Furbank 1999). A Frut6P é então convertida para glicose 6-fosfato (Glc6P), glicose 1-fosfato e finalmente para UDP-glicose via UDPGlc-pirofosforilase. A síntese da sacarose é controlada pela atividade da sacarose fosfato sintase (SPS) (EC 2.4.1.14) que catalisa a reação  $\text{UDP-glicose} + \text{Frut6P} \Rightarrow \text{UDP} + \text{sacarose 6-fosfato (Suc6P)}$ , sendo posteriormente hidrolisada pela sacarose fosfato fosfatase (SPP) (EC 3.1.3.24). Esta última reação, que também é irreversível, gera sacarose, que será translocada para os tecidos dreno; e Pi, que retornará ao cloroplasto via translocador de fosfato para o contínuo suprimento de trioseP para o citosol. A sacarose produzida nas folhas é transferida para o floema e transportada até os entrenós, onde é armazenada.

Por outro lado, a clivagem da sacarose é catalisada por duas enzimas: a invertase (EC 3.2.1.26) e a sacarose sintase (EC 2.4.1.13). A invertase é uma hidrolase que cliva a sacarose em dois monossacarídeos: glicose e frutose (através da reação:  $\text{sacarose} + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{glicose} + \text{frutose}$ ). Há várias isoformas de invertase com diferentes propriedades bioquímicas que podem acumular-se no citoplasma (invertase neutra), no vacúolo (invertase ácida) e no espaço extracelular (invertase da parede celular). A sacarose sintase (SS) é uma glicosiltransferase que, na presença de UDP, converte a sacarose em UDP-glicose e frutose. Embora exista certa controvérsia a respeito de uma possível atividade de síntese da sacarose pela SS, a maior parte das evidências demonstra que essa enzima poderia ser responsável pela clivagem da sacarose (Botha e Black 2000). Há duas isoformas para esse gene em plantas, denominadas SUS1 e SUS2 (Sucrose synthase 1 e 2, respectivamente) (para uma revisão veja Moore 1995).



**Figura 1.** Esquema das enzimas participantes da via metabólica de síntese de sacarose. Nesse esquema estão relacionadas as reações enzimáticas envolvidas na via metabólica da síntese de sacarose. Modificado a partir de Henrik Johansson, 2003. Em azul estão listadas as enzimas participantes da via de síntese de amido e em verde da via de síntese de sacarose.

Desde 1960 vários grupos tentam elucidar os fatores determinantes no acúmulo de sacarose, apresentando resultados muitas vezes conflitantes. Na década de 60, a enzima invertase ácida solúvel (SAI) era identificada como a principal responsável na regulação do acúmulo de sacarose. Pesquisas mais recentes apontam outras enzimas, tais como a SS ou um balanço de atividade entre diversas enzimas como responsáveis na regulação do acúmulo de sacarose. Nenhum desses estudos pode ser considerado conclusivo, uma vez que as comparações foram feitas entre condições ambientais divergentes, envolvendo diferentes germoplasmas e tecidos das plantas.

Baseado em resultados obtidos por análise de níveis enzimáticos e quantidade de açúcar em várias progênies de cana-de-açúcar, concluiu-se que o conteúdo de sacarose está fortemente correlacionado com as atividades de SPS e SAI, propondo-se que o acúmulo de sacarose só é possível quando a atividade de SPS excede a da SAI (Botha e Black, 2000). Porém, a diminuição da atividade da SAI nem sempre é evidente durante o processo de acúmulo de sacarose tornando incerta a proposta do acúmulo de sacarose ser causado pela sua redução (Ebrahim et al, 1999). Também são divergentes os resultados obtidos com a enzima SS que também parece possuir atividade de síntese, apesar de sua principal atividade ser a de clivagem de sacarose. Em um estudo feito entre genótipos de uma população F1 segregante, Zhu e colaboradores (1997) e Botha e Black (2000) não encontraram correlação significativa entre a atividade da enzima SS e o acúmulo de sacarose, resultado distinto do observado em diversos estudos e que relacionam positivamente o aumento de seus níveis com a taxa de acúmulo de sacarose e de maturação (Lingle 1997; Lingle e Irvine, 1994).

Whitthaker e Botha (1999) estudaram a atividade da enzima fosfofrutoquinase pirofosfato-dependente (PFP), que catalisa a conversão de frutose 6-fosfato e pirofosfato para frutose 1,6-bifosfato e fosfato inorgânico. Foi observada uma correlação inversa com o conteúdo de sacarose em diversas variedades comerciais de cana-de-açúcar e também em uma população F1 segregante.

Em estudos recentes, Casu e colaboradores (2003) obtiveram dados interessantes no perfil de expressão gênica analisado por arranjos de DNA. Por exemplo, transcritos de enzimas envolvidas na síntese e clivagem de sacarose, tais como SPS e SS, foram significativamente reprimidos em tecidos de entrenó maduro, assim como transcritos para 3 enzimas regulatórias, tais como frutose-2,6-bifosfato, PFP e fosfoglicomutase.

Todos esses dados nos levam a concluir o quão complexo é a regulação da síntese de carboidratos em cana-de-açúcar.

#### *Regulação de genes envolvidos no acúmulo de sacarose*

Apesar dos mecanismos de acúmulo de sacarose serem amplamente estudados em cana-de-açúcar, existem poucos relatos sobre sua regulação gênica. Em outras espécies, algumas pesquisas vem sendo feitas com plantas transgênicas superexpressando ou silenciando genes que participam da via metabólica de carboidrato.

Ma et al (2000) obtiveram plantas transgênicas de cana-de-açúcar expressando um gene da invertase ácida (SAI) na orientação anti-senso e verificaram que a linhagem produzida apresentava uma moderada inibição na atividade da SAI além de um aumento de 2 vezes no acúmulo de sacarose. Em plantas transgênicas de tabaco foi observada uma associação entre acúmulo de hexose e redução de transcritos relacionados com fotossíntese e acúmulo de transcritos relacionados com patogenicidade (Herbers et al, 1996). Foi também constatado um bloqueio no desenvolvimento do pólen, induzindo macho-esterilidade na planta (Goetz et al, 2001), relacionando a enzima invertase como sendo essencial na clivagem extracelular da sacarose para o fornecimento de carboidratos para os tecidos de reserva, via apoplasto.

A enzima sacarose fosfato fosfatase (SPP) catalisa a última reação na síntese de sacarose na formação da sacarose-6-fosfato via SPS. Essa enzima foi recentemente clonada e caracterizada em arroz (Lunn et al, 2000), sendo proposto seu possível envolvimento na regulação da síntese de sacarose. Seu padrão de expressão também foi caracterizado em arroz (Chavez-Barcenas et al, 2000), sendo observado uma expressão limitada às células do mesófilo nas folhas, no escutelo em plântulas e no pólen de inflorescências imaturas. Plantas de tabaco silenciadas para esse gene apresentaram níveis reduzidos de sacarose e hexoses, e um aumento no nível de amido. Sua inibição também resultou no acúmulo da enzima sacarose-6-fosfato, comparado às plantas controle, propondo seu real envolvimento no controle da atividade fotossintética (Chen et al, 2005a).

Para a enzima SPS são vários os relatos de controle de sua atividade. Em um trabalho onde 3 isoformas de SPS foram silenciadas individualmente em tabaco, constatou-se que apenas a isoforma C apresentou uma mudança no metabolismo de carboidrato, aumentando o conteúdo de amido em suas folhas (Chen et al, 2005b). Já a superexpressão da SPS de milho em tabaco resultou numa floração precoce e em maior número, além do aumento na atividade da enzima e

no conseqüente aumento na taxa fotossintética. Essa superexpressão também causou um aumento nos níveis de sacarose e amido nas folhas (Baxter et al, 2003).

### **3. A cana-de-açúcar como modelo: Projetos SUCEST e SUCAST**

O projeto EST da cana-de-açúcar (SUCEST) disponibilizou um conjunto básico e fundamental de dados para um maior entendimento dos processos fisiológicos e bioquímicos da cana-de-açúcar. Foram gerados 43.141 prováveis transcritos de cana-de-açúcar (SASs, *Sugarcane Assembled Sequences*), dos quais atualmente cerca de 29,7% não apresentam nenhuma homologia com seqüências gênicas ou protéicas previamente identificadas em qualquer outro organismo (Vettore et al, 2003).

Com o objetivo de caracterizar as seqüências obtidas através do projeto SUCEST, foram iniciados diversos projetos em laboratórios especializados em diferentes linhas de pesquisa. Um exemplo desses projetos de *datamining* é o SUCAST (*Sugarcane Signal Transduction*), um projeto criado para identificar ESTs envolvidos em vias de transdução de sinal na cana-de-açúcar (Souza et al, 2001). O foco principal desse projeto foi o estudo de módulos que regulam processos de crescimento e desenvolvimento e que são conservados em outros organismos (receptores, proteínas-G, fatores de transcrição, quinases, fosfatases, ciclases, etc.). Conhecendo melhor os genes envolvidos nestas vias conservadas está sendo possível fazer inferências sobre diferentes aspectos do metabolismo da cana-de-açúcar, tais como os mecanismos de sinalização em resposta ao ataque de patógenos e a diferentes condições ambientais. O esclarecimento do modo de ação de cada produto gênico dentro das vias metabólicas revela potenciais alvos para o melhoramento dirigido das variedades de cana-de-açúcar.

Até agora foram identificados mais de 2.900 SASs contendo ESTs de componentes de vias de transdução de sinal na cana-de-açúcar, que parecem ser bastante conservadas de acordo com o que se conhece sobre estas vias em plantas e outros organismos. Em *Arabidopsis* existem mais de 5 mil genes catalogados para vias de transdução de sinal e portanto, pode-se estimar que em cana-de-açúcar exista também um número de genes dessa ordem.

O passo seguinte à identificação de ESTs das vias de transdução de sinal é a verificação do padrão de expressão destes genes, para que se possa inferir sua função nos diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento da cana-de-açúcar.

#### **4. Tecnologia de microarrays**

A manutenção, propagação e evolução da vida nos diferentes organismos dependem de uma complexa e organizada rede de interações bioquímicas entre os genes e seus produtos – RNA e proteínas. Os estudos tradicionais em biologia molecular até recentemente estavam normalmente restritos a análises pontuais que impediam uma visão mais abrangente do funcionamento sincronizado dos genes. As metodologias tradicionalmente empregadas em ensaios de expressão gênica (*Northern blot*, RT-PCR) permitem avaliar um número muito pequeno de genes (Taniguchi et al, 2001). Nos últimos anos foram desenvolvidas algumas novas tecnologias que permitem a análise simultânea de um grande número de genes, tais como o SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*, Velculescu et al, 1995) e os *microarrays* de DNA, oligonucleotídeos e proteínas (Schena et al, 1995, 1998; Lueking et al, 1999; Blohm e Guiseppi-Elie, 2001). Os arranjos de DNA (*DNA microarrays*, *DNA chips* ou *biochips*) surgiram como uma alternativa promissora para monitorar a atividade do genoma de forma mais completa e integrada.

Os *chips* são confeccionados por máquinas robotizadas que trabalham em alta velocidade e precisão. Amostras de DNA de seqüência conhecida são depositadas em suportes de vidro ou náilon e hibridadas com amostras marcadas do RNA que se deseja investigar. O princípio do *microarray* é o pareamento de bases ou hibridação. Através do pareamento complementar sonda/amostra podem ser verificados os padrões de expressão de milhares de genes, comparando-se a intensidade do seu sinal nos diversos tratamentos. A quantidade de material hibridado a uma determinada amostra serve ainda como medida da abundância do transcrito numa população de mRNA.

#### **5. Estudo do transcriptoma da cana-de-açúcar**

Os primeiros estudos utilizando ESTs de cana-de-açúcar foram desenvolvidos pelo grupo da África do Sul, utilizando amostras de palmito e colmo (Carson e Botha, 2000; Carson e Botha, 2002). Apesar de terem analisado apenas uma pequena coleção de seqüências (< 500 ESTs), os dados foram suficiente para nos mostrar a diversidade das funções fisiológicas envolvidas na cana e também que a análise de ESTs é um poderoso método na investigação do transcriptoma da cana. As primeiras observações foram que enquanto os entrenós da cana acumulam grandes quantidades de açúcar, os genes associados ao metabolismo de sacarose não se mostraram como

abundantes nesse tecido. Esse trabalho inicial foi seguido de estudos envolvendo biblioteca de subtração visando a identificação de genes preferencialmente expressos em entrenós maduros de cana. E mais uma vez, os genes identificados não possuem relação com o metabolismo de sacarose (Carson et al, 2002).

A maior coleção de ESTs de cana-de-açúcar seqüenciados provém do projeto SUCEST. A partir de seu banco de dados foi possível identificar genes associados ao estresse por frio (Nogueira et al, 2003) e também por estresse oxidativo (Kurama et al, 2002); genes inibidores de protease associados a resistência a patógeno (Soares-Costa et al, 2002, Falco e Silva-Filho, 2003 e Mello et al, 2003), tecido-especificidade envolvida na transdução de sinal (Papini-Terzi et al, 2005) e também avaliar tecido-especificidade de transposons (de Araujo et al, 2005).

A Austrália também contribui na pesquisa em genômica de cana-de-açúcar. Seu principal objetivo é a identificação de genes envolvidos na maturação de entrenós, e conseqüentemente no processo de acumulação de sacarose (Casu et al, 2001, 2003 e 2004). Todos esses estudos basearam-se em uma coleção de 7,409 ESTs de entrenós maduros, um tecido não estudado no projeto SUCEST (Vettore et al, 2001, 2004). Esses dados, aliados a uma pequena coleção (1,089) de ESTs de entrenós imaturos e análise por cDNA microarrays, permitiu ao grupo avaliar genes diferencialmente regulados na maturação do entrenó. Esses estudos confirmaram que genes associados ao metabolismo de sacarose não são diferencialmente expressos nos entrenós (Casu et al, 2001, 2003). Porém, um gene codificante para um transportador de hexose foi o que apresentou a maior expressão diferencial em entrenós maduros. Sua expressão nas células companheiras e no parênquima vascular permite uma especulação no seu envolvimento no acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar (Casu et al, 2003). A análise desses ESTs por cDNA microarrays também foi utilizada para investigar outros genes associados à maturação do entrenó (Casu et al, 2004). Os autores encontraram como diferencialmente expressos nesses tecidos genes associados com síntese e processamento de proteínas, além de metabolismo primário. A maturidade do entrenó é associada com a abundância de transcritos envolvidos com lignificação e suberização, e também com a redução de expressão de histonas associadas com a replicação de DNA, o que provavelmente reflete uma menor taxa de divisão celular nesse tecido.

Claramente, um rápido progresso tem sido feito nesses anos para o entendimento do transcriptoma da cana-de-açúcar. Porém são poucos os relatos que usam populações segregantes para determinada característica afim de se identificar genes ligados a tal. Apenas recentemente

Casu et al (2005) publicaram resultados preliminares de um estudo de expressão gênica baseando nessa estratégia. Em seu artigo, os autores relatam que análises envolvendo uma população segregante para teor de sacarose estão em andamento. Vale ressaltar que apesar do conflito de interesses entre os nossos trabalhos, o que apresentaremos aqui ainda continua sendo inédito, uma vez que nenhum desses trabalhos estudaram o envolvimento do acúmulo de sacarose na sinalização por açúcar.

## ***OBJETIVOS DO TRABALHO***

---

Na fase subsequente à identificação de genes de interesse da cana-de-açúcar é desejável que alvos de melhoramento genético sejam definidos. Os nossos estudos visam ao futuro desenvolvimento de variedades mais produtivas de cana-de-açúcar, que possam acumular uma maior quantidade de sacarose.

Sendo assim, o principal objetivo desse trabalho foi identificar genes possivelmente envolvidos na síntese e acúmulo de sacarose em indivíduos contrastantes para teor de sacarose em uma população segregante de cana-de-açúcar.

## **APRESENTAÇÃO DO TRABALHO**

---

A identificação de genes neste presente trabalho baseou-se em 4 frentes de pesquisa. Os 3 primeiros capítulos basearam-se em resultados de hibridações de microarranjos de DNA, utilizando-se o *chip* SUCAST. Neles serão relatados análise de expressão gênica em diferentes tecidos de cana-de-açúcar e também em indivíduos contrastantes para teor de açúcar pertencentes a uma população segregante. O quarto capítulo baseou-se em um *datamining* no banco SUCEST para a identificação de transportadores de açúcar em cana. Nele será relatado a caracterização e o provável envolvimento destas proteínas no acúmulo de açúcar.

**Capítulo I.** Diversos processos metabólicos envolvidos no crescimento, desenvolvimento e adaptação a variações ambientais são regulados por vias de transdução de sinal. No projeto SUCAST foram catalogados mais de 3,500 possíveis genes de cana-de-açúcar envolvidos nestas vias. Através da técnica de *microarrays* foi possível analisar o padrão de expressão de 1,280 genes catalogados no SUCAST em diferentes tecidos de cana-de-açúcar. Dentre estes, 217 (17%) apresentaram expressão diferencial em duas amostras biológicas em pelo menos um tecido analisado. E um total de 153 genes (12%) apresentaram uma expressão ubíqua em todos os tecidos analisados. Esse trabalho foi publicado na revista *DNA Research*.

**Capítulo II.** Para analisar o envolvimento das vias de transdução de sinais na síntese de sacarose, *chips* SUCAST foram hibridados com amostras de folha madura de indivíduos contrastantes para teor de sacarose, coletadas 3 meses pós-plantio. Foram identificados 24 ESTs diferencialmente expressos. A análise de expressão e seu possível envolvimento na síntese de sacarose foram discutidos no artigo aceito na revista *Plant and Cell Physiology*.

**Capítulo III.** Nesse artigo, os mesmos *chips* de cDNA SUCAST foram utilizados para analisar o envolvimento das vias de transdução de sinais no acúmulo de sacarose. Para tal foram utilizadas amostras de entrenós imaturos e maduros (1, 5 e 9 respectivamente) de indivíduos contrastantes para teor de sacarose, coletadas 7 meses pós-plantio. Dessa análise foi possível identificar 88 ESTs diferencialmente expressos. A análise de expressão e seu possível envolvimento no acúmulo de sacarose está discutido nesse capítulo, sendo que esse manuscrito está em fase final de preparação.

**Capítulo IV.** São várias as evidências da importância dos transportadores de açúcar nas plantas. Dessa maneira foi feita uma busca por SASs ortólogos a transportadores de açúcar no banco de dados do projeto SUCEST. Foram encontrados 13 ESTs que codificam prováveis transportadores de açúcar. A análise de seus diferentes padrões de expressão e seu possível envolvimento no acúmulo de sacarose será discutida nesse presente capítulo, sendo que esse manuscrito está em fase final de preparação.

**Transcription Profiling of Signal Transduction-Related Genes in  
Sugarcane Tissues**

Flávia Stal Papini-Terzi, Flávia Riso Rocha, Ricardo Zorzetto Nicoliello Vêncio,  
Kátia Cristina Oliveira, **Juliana de Maria Felix**, Renato Vicentini, Cristiane de  
Souza Rocha, Ana Carolina Quirino Simões, Eugênio César Ulian, Sônia Marli  
Zingaretti di Mauro, Aline Maria Da Silva, Carlos Alberto de Bragança Pereira,  
Marcelo Menossi, and Gláucia Mendes Souza

*DNA Research* **12**, 27–38 (2005)

## Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues

Flávia Stal Papini-Terzi<sup>1#</sup>, Flávia Riso Rocha<sup>1#</sup>, Ricardo Zorzetto Nicoliello Vêncio<sup>2</sup>, Kátia Cristina Oliveira<sup>1</sup>, **Juliana de Maria Felix**<sup>3,4</sup>, Renato Vicentini<sup>4</sup>, Cristiane de Souza Rocha<sup>4</sup>, Ana Carolina Quirino Simões<sup>1</sup>, Eugênio César Ulian<sup>5</sup>, Sônia Marli Zingaretti di Mauro<sup>6</sup>, Carlos Alberto de Bragança Pereira<sup>2</sup>, Aline Maria da Silva<sup>1</sup>, Marcelo Menossi<sup>3,4</sup>, Gláucia Mendes Souza<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Estatística, Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

<sup>4</sup>Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

<sup>5</sup>Centro de Tecnologia Copersucar, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

<sup>6</sup> Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

\*Corresponding author.

#The first two authors contributed equally to this work.

Running title: The SUCAST Catalogue

Mailing address:

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Departamento de Bioquímica

Av. Prof. Lineu Prestes 748 Bloco 12 térreo sala 1208

05508-900 São Paulo, SP, Brasil

Phone: + 5511 3091-3815 ext. 216

FAX: + 5511 3091-2186

Email: [glmsouza@iq.usp.br](mailto:glmsouza@iq.usp.br)

Accession numbers:

The gene expression data was deposited in The Gene Expression Omnibus (GEO) Database under access numbers GSE1702 (series), GPL1375 and GPL1376 (platforms) and GSM29453 to GSM29506 (samples).

Supplementary Materials can be found at <http://www.sucest-fun.org/pub/SUCAST>.

## **Abstract**

A collection of 237,954 sugarcane ESTs was examined in search of signal transduction genes. Over 3,500 components involved in several aspects of signal transduction, transcription, development, cell cycle, stress responses and pathogen interaction were compiled into the Sugarcane Signal Transduction (SUCAST) Catalogue. Sequence comparisons and protein domain analysis revealed 477 receptors, 510 protein kinases, 107 protein phosphatases, 75 small GTPases, 17 G-proteins, 114 calcium and inositol metabolism proteins and over 600 transcription factors. The elements were distributed into 29 main categories subdivided in 409 sub-categories. Genes with no matches in the public databases and of unknown function were also catalogued. A cDNA microarray was constructed to profile individual variation of plants cultivated in the field and transcript abundance in six plant organs (flowers, roots, leaves, lateral buds, 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> internodes). From 1280 distinct elements analyzed, 217 (17%) presented differential expression in two biological samples of at least one of the tissues tested. A total of 153 genes (12%) presented highly similar expression levels in all tissues. A virtual profile matrix was constructed and the expression profiles were validated by real-time PCR. The expression data presented can aid in assigning function for the sugarcane genes and be useful for promoter characterization of this and other economically important grasses.

*Keywords:* *Saccharum*, sugarcane, microarray, signal transduction, transcriptome

## Introduction

The unraveling of signal transduction pathways is of strategic importance to the understanding of fundamental processes such as growth and development as well as cellular responses triggered by biotic and abiotic stresses. In recent years, the wealth of information related to signal transduction generated by several genome sequencing projects, coupled to the global transcription profiling of a diversity of organisms, has brought many aspects of signaling under scrutiny. Protein superfamilies, such as protein kinases and transcription factors, have been systematically classified and analyzed following their identification by the sequencing projects<sup>1,2,3,4</sup> and comparative studies of complete genomes are defining the conserved signaling modules and revealing their inherent differences<sup>5,6,7</sup>.

The tropical crop sugarcane (*Saccharum* sp.) is of great economical interest, contributing to about two thirds of the world's raw sugar production. In some countries, part of the crop is also destined to the production of ethanol, a less polluting fuel alternative. Traditional breeding programs that select for varieties showing high productivity and resistance to stresses and diseases are slow. Therefore, it could be greatly advantageous to have genes associated with desirable traits targeted for directed improvement of sugarcane varieties. With the aim of expediting sugarcane genomics, the SUCEST consortium (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br/public>) sequenced and annotated 237,000 ESTs (Expressed Sequence Tags) derived from 26 cDNA libraries<sup>8</sup>. The sequences were assembled into 43,141 contigs or SAS (Sugarcane Assembled Sequences) covering an estimated 90% of the expressed genome. As for all other cDNA and genomic sequences released, the challenge now is to attribute relevant biological information to the extracted data. Several studies have described particular features of sugarcane's general metabolism, growth and development based on the analysis of the data from the SUCEST project<sup>9</sup>. Notwithstanding, given the enormous amount of data generated by a project of this magnitude, many topics remain to be investigated. The SUCAST Project (Sugarcane Signal Transduction)<sup>10</sup> is an ongoing effort that aims to identify the sugarcane signaling components and define their role in grasses. In this study, we present the SUCAST Catalogue and its categories, and investigate gene expression patterns using cDNA microarrays.

## Materials and Methods

### *Annotation*

The Sugarcane cDNA sequences can be found at the SUCEST database (<http://sucest.lbi.ic.unicamp.br/public/>) and Genbank under Accession Numbers CA064599-CA301538. Members of the SUCAST catalogue were identified using the BLAST algorithm<sup>11</sup> with conserved protein sequences as drivers. Conserved protein family domains were identified by searches at the Pfam<sup>12</sup> and SMART<sup>13</sup> databases using default parameters.

### *PCR amplification and array printing*

Sugarcane cDNA plasmid clones of 1,632 ESTs obtained from the SUCEST collection were re-arranged and amplified in 100µl PCR reactions (40 cycles, annealing at 51°C), directly from bacterial clones in culture, using T7 and SP6 primers. Ninety percent of the clones had their identity validated by re-sequencing. PCR products were purified by filtration using 96 well filter plates (Millipore Multiscreen® MAFBN0B50). Samples were visualized on 1% agarose gels to inspect PCR-amplification quality and quantity. Purified PCR products (in 10mM Tris-HCl pH 8.0 solution) were mixed with an equal volume of DMSO in 384 well V-bottom plates. Microarrays were constructed by arraying cDNA fragments on DMSO optimized, metal coated glass slides (type 7, Amersham Biosciences) using the Generation III Microarray Spotter (Molecular Dynamics/Amersham Pharmacia Biotech). Each cDNA fragment was spotted on the slides at least four times (i.e., technical replicates). Following printing, the slides were allowed to dry and the spotted DNA was bound to the slides by UV-cross linking (50mJ).

### *Sugarcane Tissue Samples*

Two different samples (i.e., biological samples) were collected for cDNA microarray tissue profiling from leaves (LV), flowers (FL), lateral buds (LB), roots (RT), first internode (IN1), and fourth internode (IN4) of distinct plants. Five leaf samples, each from a single field grown plant, were collected to be tested for field variability (LV-1, LV-2, LV-a, LV-b, LV-c). Culms of the commercial variety SP80-3280 were planted in May 2001 and May 2002 at the Copersucar Experimental Station. The first leaf with a visible dewlap (leaf+1) was collected from a 12-month-old plant for the LV-1 sample, from a 14-month-old plant for the LV-2 sample (both

planted in 2001) and from 12 month-old plants for LV-a, LV-b and LV-c (planted in 2002). Two flower samples were collected from immature inflorescences (variety SP87-342) with 5 to 30 cm (FL-1) or ~50 cm (FL-2) in length. Lateral bud and root samples derived from single eyed seed setts collected from 12 to 14-month-old field grown plants (variety SP80-3280). For the LB-1 and RT-1 samples, seed setts were treated with Benlate (Benomyl) 0.6 g/l and Decis (Deltamethrin) 5 ml/l, and germinated in the dark on wet paper towels for 10 days at 25°C. For the LB-2 and RT-2 samples, seed setts were planted in 200 ml plastic cups containing moist white sand and tissues were collected after 12 days. The internode samples were collected from field grown plants of the commercial variety SP80-3280. For the IN1-1 and IN1-2 samples, the leaves were removed and the first and second internodes visible below the apical meristem were used. For the IN4-1 and IN4-2 samples, the fourth internode was collected. Also, an independent collection of leaves, flowers, lateral buds, roots, first internode and fourth internode was performed, which were used in real-time PCR assays. Tissues were sectioned, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C .

#### *RNA extraction*

Frozen tissues were grinded using a homogenizer. 2 – 2.5g were weighted and grinded to a fine powder, in liquid nitrogen, using pre-cooled mortar and pestle. The pulverized tissue was transferred to a 50 ml tube and homogenized with 5 ml Trizol® (Life Technologies) per gram of tissue according to the manufacturer's instructions. RNA pellets were resuspended in 20 µl of warm diethyl pyrocarbonate-treated water, vortexing gently for about 15 min. RNA samples were quantified in a spectrophotometer and loaded on 1.0% agarose/formaldehyde gels for quality inspection. An equimolar pool of RNA samples of five sugarcane tissues (flower, leaf, stem, root, bud) was prepared to be used as a common reference in all hybridizations.

#### *Probe Preparation and Hybridization*

Ten micrograms of total RNA were reverse transcribed, labeled, and hybridized using the reagents provided with the *CyScribe Post-Labeling kit* (Amersham Biosciences), according to the manufacturer's instructions. The products of the labeling reactions were purified in Millipore Multiscreen® filtering plates to remove unincorporated labeled nucleotides. Microarrays were co-hybridized with the fluorescently labeled probes. Hybridizations were performed overnight at 42°C in humid chambers. The slides were then washed in 1x SSC and 0.2% SDS (10 min, 55°C),

twice in 0.1x SSC and 0.2% SDS (10 min, 55°C), and in 0.1 x SSC (1 min, RT). Slides were rinsed briefly in filtered milli-Q water and dried with a nitrogen stream. Each experimental step was carefully monitored to ensure high quality of the slides and extracted data. The hybridizations were performed as displayed in table I.

#### *Data acquisition, processing and statistical analysis*

Slides were scanned using the *Generation III Scanner*<sup>TM</sup> (Molecular Dynamics) adjusting the photomultiplier tube (PMT) to 700 for both channels. Images were processed and data collected using the *ArrayVision* (Imaging Research Inc.) software. Local median background was subtracted from the MTM (median-based trimmed mean) density for each spot. Data from clones that generated poor-quality PCR fragments (no amplification or unspecific bands) or poor-quality spots (visually inspected) were excluded. The data were stored and managed by the BioArray Software environment<sup>14</sup> free web-based database.

A set of custom programs based on R language<sup>15</sup> were developed for data processing based on methods described previously<sup>16</sup> (available at <http://verjo19.iq.usp.br/xylella/microarray/>). Pearson correlation values among the leaf samples were calculated using normalized expression ratios obtained from leaf versus pool hybridizations for 1280 genes (Table S-I). We used homotypic or ‘self-self’ hybridizations of the reference pool sample to define intensity-dependent cutoff levels that would indicate differentially expressed genes. Based on these results, eight intervals were set integrating the probability density function to 99.5% for different signal intensity levels, which were used to define differentially expressed genes in the inspected tissues. Figure S1 shows the data from four ‘self-self’ hybridizations of the reference pool sample computed to establish the limits of the random variations in the SUCAST microarray experiments. The fluorescence ratios were normalized to account for systematic errors using the LOWESS fitting<sup>17</sup> and used to calculate the expression ratios for all genes between the tissue sample and the reference sample (Tables S-I and S-II). For every gene, the percentage of replicates within or outside the cutoff limits was calculated in each tissue sample (Table S-III). Genes with at least 70% of the replicate points above or below the cutoff limits were considered differentially expressed in that particular sample, while genes with 55% of the points within the cutoff were considered ubiquitous among samples.

For the clustering analysis and the visualization of a profile matrix, a single intensity

value for each gene was obtained calculating the median of all replicate points representing the same clone. Data were clustered hierarchically using the UPGMA (unweighted pair-group method average) algorithm with the Euclidean distance as measure. Further details are available at the supplementary web site (<http://www.sucest-fun.org/pub/SUCAST>).

#### Validation of microarray results by real-time PCR (RT-PCR)

Five micrograms of total RNA were treated with DNase (Promega) according to the manufacturer's instructions and an aliquot of 7.5  $\mu$ l of the treated RNA was reverse-transcribed using the SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). The 20  $\mu$ l reverse transcription reactions contained the RNA template, 2  $\mu$ l 10X RT buffer, 0.5 mM each dATP, dGTP, dCTP and dTTP, 50 ng random hexamers, 0.25  $\mu$ g oligo(dT), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT (dithiothreitol), 40 U Rnase OUT and 50 U SuperScript II Reverse Transcriptase. RNA, random hexamers, dNTPs, and oligo(dT) were mixed first, incubated at 70°C for 5 min and placed on ice. Subsequently, the remaining components, except the SuperScript II Reverse Transcriptase, were added to the reaction and the mixture was heated to 25°C for 10 min and then incubated at 42°C for 2 min. The SuperScript II Reverse Transcriptase was added to each tube and the reaction was incubated at 42°C for 1.5 h, 72°C for 10 min, and chilled on ice. An identical reaction without the reverse transcriptase was performed as a control, to confirm the absence of genomic DNA. The cDNA product was treated with 2 U of RNaseH (Invitrogen) for 30 min at 37°C and for 10 min at 72°C. Real-time PCR reactions were performed using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Primers were designed using the Primer Express 2.0 Software (Applied Biosystems). BLAST searches against the SUCEST database were conducted to ensure the specificity of the selected primers. The primer sequences designed are listed in Table S-IV. Each reaction was performed in duplicates and contained 2  $\mu$ l of a 1:10 dilution of the synthesized cDNA, primers to a final concentration of 600 nM each, 12.5  $\mu$ l of the SYBR Green PCR Master Mix and PCR-grade water to a total volume of 25  $\mu$ l. The parameters for the PCR reaction were 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The specificity of the amplified products was evaluated by the analysis of the dissociation curves generated by the equipment. Negative controls were also prepared in order to confirm the absence of any contamination. The ratio between the relative amounts of the target gene and the endogenous control gene in

the RT-PCR reactions was determined based on the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method<sup>18</sup> with modifications. The normalized expression level was calculated as  $L = 2^{-\Delta C_t}$  and  $\Delta C_T = C_{T, \text{target}} - C_{T, \text{reference}}$ , for each tissue. To classify a gene's distribution of expression levels among the different tissues, ranging from ubiquitous to tissue-specific, we used the Entropy measure<sup>19</sup>:

$$H_{\text{gene}} = \sum p_t \cdot \log_6(1/p_t)$$

where  $p_t = L_t / \sum L_t$ ,  $L_t$  is the expression level of the gene in the t-th tissue, and the sums are taken over the six tissues.

## Results and Discussion

### *The SUCAST Catalogue*

Plant responses to developmental and environmental signals rely on the activity of different cellular components, which detect these signals and transduce them through the cytoplasm and nucleus to trigger the appropriate metabolic answer. These signaling pathways coordinate growth and development, as well as responses to stress and pathogens. With the aim of creating a signal transduction catalogue for sugarcane we undertook a detailed survey of 43 thousand transcripts identified by the SUCEST project<sup>8</sup>. This EST project sequenced the 5' and 3' end of clones from 26 libraries prepared from 11 different sugarcane tissues and plants submitted to 3 stress treatments. The large sampling of many tissues allowed possibly 90% of the sugarcane expressed genes to be tagged.

We used BLAST<sup>11</sup> searches, Pfam<sup>12</sup> and SMART<sup>13</sup> domain analyses to identify conserved signal transduction components such as receptors, adapters, G-proteins, small GTPases, members of the two-component relay system, nucleotide cyclases, protein kinases, protein phosphatases and elements of the ubiquitination machinery and infer their putative functions. Around 2,000 SAS encoding signal transduction related proteins and also 611 transcription factors were indexed in the SUCAST catalogue, which is organized in 29 categories and 409 subcategories (Table S-V). These elements represent 5% of the total SAS from the current SUCEST dataset. In addition, 717 SAS that might be involved in processes triggered by stress and pathogens or that may play a role in growth and development were also catalogued. Table II summarizes the SUCAST categories. The combined analysis of the sugarcane EST data bank, by means of an in depth annotation and gene architecture analysis, generated a catalogue with 3,563 members, which covers several aspects of signaling and transcription. It includes around 100 SAS for hormone biosynthesis<sup>10</sup> and also 548 SAS with no similarities to known proteins, which were selected due to our interest in associating function to new genes.

On the basis of sequence analysis, it has been inferred that 13% of the *Arabidopsis* genes are involved in transcription or signal transduction<sup>20</sup>. The automated categorization of the SUCEST data indicated that 13.6% of the tagged genes belong to these categories<sup>8</sup>. With a genome size expected to be similar to the rice genome, the sugarcane genome might have around

3 thousand genes encoding putative signal transduction components.

#### *The SUCAST cDNA microarray*

To evaluate the expression profile of the SUCAST components in different sugarcane tissues we constructed glass slide cDNA microarrays with PCR products derived from 1632 cDNA clones. For 21% of the clones we could not obtain satisfactory PCR fragments and the corresponding data were removed from the analysis. Therefore, data of transcript abundance for 1280 SAS are presented as indicated in the categories of Table II. As a reference sample in all microarray hybridizations we used an equimolar pool of total RNA extracted from flowers, lateral buds, leaves, stems and roots.

#### *Assessing individual variability in the field*

Since sugarcane is propagated vegetatively, the genetic variability among the individuals should be low. Expression patterns obtained assaying few individuals of the same variety should be representative of a population in the field, provided that growth conditions are similar. To minimize individual differences and differences attributable to and local field variations, RNA samples were typically obtained from more than one plant in our experiments. Even so, we reasoned that it would be important to evaluate if the individual variability was as low as expected. With that purpose, we collected leaves from five different sugarcane individual stools and extracted the RNA separately. Leaves were collected in May 2002 (LV-1), July 2002 (LV-2) and May 2003 (LV-a, LV-b, LV-c). The RNA samples were labeled and hybridized to the microarrays against the reference sample (Table S-I). Pair-wise Pearson correlation calculations show a high correlation between leaves of the three individuals collected at the same time or within a short interval of time (0.84 to 0.88), and a lower correlation between individuals collected in different years (0.61 to 0.64) (Figure S2). The results imply sufficiently low individual variation within each sampling event, and even between close events, and indicate that pooling a large number of plants to represent a subpopulation is not necessary.

#### *Differentially and evenly distributed genes*

Total RNA samples extracted from six different sugarcane tissues were labeled and

hybridized to the microarrays against the reference sample. Two different biological samples of each tissue were analyzed, and the results of at least two technical replicates were computed. Median ratio values for each gene in each sample can be found in Table S-II. Cutoff limits for differential expression were calculated based on ‘self-self’ hybridizations (see Methods). To estimate replicate data consistency, the expression ratio versus signal intensity data of the replicates of a given gene in different ‘tissue vs. pool’ hybridizations (Table I) were studied (Figure 1). Genes with at least 70% of the replicate points outside the cutoff limits (above or below) in both biological samples of one or more tissues were considered differentially expressed, whereas genes with more than 55% of the replicates within the cutoff limits were considered ubiquitous. Depicted in Figure 1 are four cases of gene expression distribution where, (a) over 70% of the data points are above the cutoff limits, indicating that this gene was more expressed in the tissue being tested than in the reference; (b) all the replicates are within the cutoff limits, indicating that there was no differential expression; (c) a variable pattern among the replicates was observed, showing low reproducibility for the expression levels of the gene; (d) over 70% of the data points are below the cutoff limits, indicating that this gene is less expressed in the tissue being tested than in the reference. A graphical representation of the global distribution of the data in the M-S space, taking into account the reproducibility of the technical replicates for each gene in each hybridization is seen in Fig. 1e and summarized in Table III. The number of genes analyzed for each tissue varied from 1045 to 1235, due to differences in the quality of some spots in different slides. The majority of the genes analyzed (avg. 76%) showed expression levels in each particular tissue similar to those of the pool of tissues. This result is in agreement with the observations of Obayashi and colleagues<sup>21</sup>, who have identified a large cluster of ubiquitously expressed genes after global macroarray analysis of the *Arabidopsis* transcriptome. It is important to note, however, that only part of the sugarcane transcriptome is represented in our array. Nevertheless, this could be an indication that the majority of the signaling elements in sugarcane are not differentially expressed in the different tissues analyzed. The highest percentages of preferential expression in one tissue were found in leaves (8.84% and 7.36%), in the RT-2 root sample (11.78%), and in the internode sample IN4-2 (8.26%). Likewise, a high proportion of the genes in these samples showed reduced expression in one particular tissue. The flower samples exhibited a high number of underrepresented or non-expressed genes (8.33% and 6.87%, respectively, for each of the two different biological samples). An average of

11% of the genes showed a variable pattern of expression, with high variation among the technical replicates.

For the majority of the genes present in our microarray there is little information in the literature regarding tissue distribution of transcripts. Cho and colleagues<sup>22</sup> performed microarray hybridizations using samples from seven different organs of maize. This approach allowed the elucidation of organ relationships and the detection of organ-specific gene expression. Recently, a comprehensive study of organ-specific gene expression has been reported for *Arabidopsis*<sup>21</sup>. Other reports focus on a few genes or specific metabolic routes, involving families of closely related genes - such as the MADS transcription factors<sup>23</sup>, genes involved in particular pathways such as the acyl lipid metabolism<sup>24</sup>, and often rely solely on EST *in silico* data. Watson and collaborators<sup>25</sup> described the mapping of the proteome of the model legume barrel medic (*Medicago truncatula*). Spatial mapping of the transcriptome and proteome of diverse plant species can shed light on the regulation of many developmental pathways.

Our results indicated 217 genes that presented differential expression in both biological samples in at least one of the tissues analyzed. These elements were clustered according to their expression patterns, evidencing groups of genes with marked expression in leaves, roots, or internodes (Figure S3). Smaller groups of genes with prominent expression in flowers and lateral buds were also uncovered. Table IV lists the SAS with enriched or reduced expression in the various tissues.

Several differentially expressed genes encode transcription factors. Among these, we detected ten highly expressed in flowers: a GARP transfactor, an AP2, four zinc-finger and four MADS-box domain containing proteins. MADS and the zinc finger YABBY transcription factor play important roles during organ development and together with AP2 and zinc finger C3H proteins, were shown to have enhanced expression levels in flowers<sup>26</sup>.

A discrete group of eight receptor genes was found to be preferentially expressed in leaves, most of which are members of the RLK (receptor-like kinase) family. We also found a sugarcane receptor possibly involved in signaling pathways in the sugarcane reproductive tissues. This SAS is very similar to MSP1 from rice and EXS/EMS1 from *Arabidopsis*. MSP1 and EXS/EMS1 are genes expressed in reproductive tissues and, among other functions, control the fate of germinative cells<sup>27,28,29</sup>. These observations indicate that this SAS possibly represents an ortholog of the MSP1 and EXS/EMS1 genes. Three SAS were found that code for putative

receptors containing a protein kinase domain and a Ubox as predicted by the SMART database<sup>13</sup>. All of them showed a homogeneous transcript distribution among the tissues analyzed. One of them, SAS SCQSRT2031C08.g, possesses a complex structure, comprised by TPRs (tetratricopeptide repeats), low complexity regions, a pkinase domain and a Ubox domain followed by a ZnF\_NFX domain (a presumed zinc binding domain) near the C-terminal. The U-box is believed to have a role in ubiquitination<sup>30</sup>. Protein kinases containing the U-box domain have already been reported for *Arabidopsis*<sup>31</sup>. However, the function of these plant proteins remains to be determined. Moreover, thirteen receptors of unknown function were found to have a differential expression pattern. Six of these presented predominant expression and seven showed weak expression in at least one of the tissues. The elucidation of the expression profiles of new receptors is of great interest, since it can help in assigning putative functions to these proteins.

It is remarkable that several genes related to the ubiquitination system have been found to be more expressed in the internodes than in the other tissues examined. The ubiquitin/26S proteasome pathway<sup>32</sup> is implicated in selected protein breakdown, used to control the level and activity of proteins in a diverse range of metabolic routes. In sugarcane, an intense protein degradation activity in the internodes could be related to their specialization in sucrose storage.

A group of hormone-related elements, including four nitrilases and three lipoxygenases, showed prevalent expression in root tissues. The nitrilases are homologous to the *Arabidopsis nit4* gene, which was characterized as being predominantly expressed in roots<sup>33</sup>. The lipoxygenases (LOX) are a functionally diverse class of dioxygenases implicated in physiological processes such as growth, senescence, and stress responses in plants, that show different organ-specific expression in different plants<sup>34,35</sup>. Another group of hormone-related genes composed by members of biosynthetic pathways of salicylic acid (phenylalanine ammonia-lyase), abscisic acid (zeaxanthin epoxidase), and ethylene (ACC oxidase, ACC synthase) biosynthetic pathways was mainly expressed in leaves.

We detected a caffeic acid 3-*O*-methyltransferase (COMT) gene expressed primarily in the fourth internode. This enzyme is involved in lignin biosynthesis and, in association with other enzymes, like the CCOMT (caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase), keeps in check the content and the composition of lignin in cells. A correlation between the lignin content of alfafa internodes of progressive maturity and the activity of COMT and CCOMT has been demonstrated<sup>36</sup>. A

sugarcane COMT has been cloned and exhibited a peak of expression in culms<sup>37</sup>. The SUCEST database indicates the presence of five complete sequences for this enzyme, that may represent a promising target for sugarcane genetic engineering with the aim of modifying the content and/or composition of sugarcane bagasse, allowing it to become a useful and low cost raw material for paper production and animal feed.

Among the 43,141 SAS in the SUCEST database, 35% did not show similarity to known proteins (no matches) and are therefore new genes of unknown function. We found nine no matches to be predominantly expressed in internodes, seven in leaves, two in roots and two in flowers (Table IV). The latter are non-coding transcripts. The involvement of non-coding RNAs in floral development has been described<sup>38,39,40</sup> and thus it is possible that these sugarcane elements are involved in gene regulation during floral development. Among all the SUCEST no matches, 2010 SAS correspond to sugarcane-specific non-coding sequences that could also contain regulatory elements.

In addition to the differentially expressed genes, we also investigated genes that showed similar expression levels in all tissues. The identification of “housekeeping” genes is of great interest in expression studies, since they are valuable experimental controls and indicate promoters useful for plant biotechnology. Among the analyzed genes 153 presented over 55% of the replicate data points within the cutoff limits for all the twelve samples analyzed (Table S-VI). A total of 35 no matches were found among them, an indication that these sugarcane specific genes may have a central role in this plant's physiology.

#### *Validation of microarray data by real-time PCR*

To validate the present work, 25 SAS (Table S-IV) were selected and analyzed by real-time PCR. To normalize the expression data, several ESTs were tested in search of a gene that showed strong and ubiquitous expression in the sugarcane tissues. An ideal reference gene has the same level of expression in all conditions under study. The commonly used tubulin gene did not show an adequate pattern, being expressed in varying levels in the tissues analyzed (Figure 2a). The same was observed for an actin gene (not shown). Based on the number of ESTs sequenced in the SUCEST project and on the expression profile obtained from the microarray data we selected two SAS as references: SCCCLR1048F12.g (a 14-3-3 gene) and SCCCST2001G02.g (a polyubiquitin gene). These genes were found to be homogeneously

expressed and adequate for normalization purposes, showing equivalent transcript levels in the tissue samples, except for a slight variation in flower tissues (for the polyubiquitin gene) and roots (for the 14-3-3 gene) (Figure 2b and c). Therefore, all our real-time PCR data was normalized to both the 14-3-3 gene and the polyubiquitin gene. When the normalization was done using the 14-3-3 gene, expression data for the root tissue was disregarded. The same was done for the flower sample when normalizing data with the polyubiquitin gene. Although none of the reference genes tested presents absolutely the same expression levels in all tissues, the use of two different reference genes increases the reliability of the results.

We considered that a gene had its expression profile validated when both results (using the 14-3-3 gene and the polyubiquitin gene as references) were consistent with the microarray data. Eighteen differentially expressed and seven ubiquitous SUCAST genes were assayed. To further confirm the expression profile obtained, the RNA samples used for the validation experiments were different from those used in the microarray hybridizations. Figures 2d through k show the relative levels of transcripts for 8 SAS normalized to the polyubiquitin levels. The results using the 14-3-3 gene as reference yielded essentially the same patterns (not shown).

To rank the differential expression results obtained in real-time PCR analysis, we measured the Entropy (H) of the distribution of expression levels among the tissues. The Entropy is widely used in Information Theory to measure how distant the observed distribution is from a uniform distribution<sup>19</sup>. Ideally, the ubiquitous genes should have a uniform distribution of expression levels in all considered tissues. According to the Entropy definition, this property is mathematically translated to H closer to 1. In contrast, tissue specific genes should have relevant expression in just one of the considered tissues and the Entropy of this expression level distribution is translated to H closer to zero (note, however, that this is not a linear scale). We observed that 6 out of 7 genes expected to present an ubiquitous expression profile, presented an H value equal to or higher than 0.9 (Table S-IV), indicating that they can represent real “housekeeping” genes. Four differentially expressed genes seem to be highly specific of one tissue, with H values below 0.6. Eight differentially expressed genes showed an enrichment in a particular tissue, as pointed out by the microarray data, but were also expressed at high levels in other tissues. In these cases, the H values were higher than the ones obtained for genes expressed in a single tissue, as expected, but always lower than 0.9.

In summary, 18 out of the 25 genes tested (72%) had a profile in real-time PCR assays

consistent with the differential or ubiquitous expression observed in the microarray experiments. It is important to stress that the RNA samples used in the real-time PCR experiments derived from a third biological sample, further suggesting that the data set generated in our microarray experiments is robust in indicating ubiquitous and differentially expressed genes. The criteria used to select the differentially expressed and ubiquitous genes, although arbitrary, proved to be effective. The selection of data with at least 70% of the replicates in agreement with the cutoff for differential expression and 55% for ubiquitous expression was adequate, as shown by the high validation rate obtained. The less stringent value for ubiquity proved to be as effective probably because the genes selected had similar expression in all biological samples of all tissues.

### *The SUCAST expression matrix*

As pointed out previously, all hybridizations were made against a common reference, consisting of a pool of tissues. When there are several samples to be compared, this strategy requires fewer hybridizations than a direct pair-wise setup, and is useful when there is no natural control (like a non-treated sample) as in treatment versus control studies. Additionally, the pool of transcripts theoretically represents the transcripts of all tissues, minimizing the occurrence of spots without hybridization signal, for which it is not possible to calculate the expression ratio.

Although this approach allowed us to identify ubiquitous and differentially expressed genes among the sugarcane tissues, it generated relative - and not absolute - information on the expression profiles. This means it evidences, for example, that a certain gene is more expressed in leaves than in the average of the tissues, but it does not tell us whether this same gene is more expressed in flowers than in roots. To get access to this type of information, we calculated “virtual ratios” between pairs of tissues, using the reference values of the common sample (pool) as the common denominator.

This approach provided us with the expression patterns of each individual SAS in the SUCAST microarray among all tissues analyzed (Table S-VII and Figure S4). Additionally, the clustering of the patterns allows a spatial comparative picture of transcript abundance, which can complement the information provided by the ratio cutoff analysis (that uses 70%-replication stringency levels). Using the matrix we could note expression patterns not evident in the previous analysis. As an example, all the four MADS transcription factors that were selected as differentially expressed due to lower expression in roots or other tissues than in the reference, are

indicated by the matrix to be primarily expressed in flowers (Table S-VII), although only SAS SCSGSB1007G01.g had been classified as such (Table IV).

### *Conclusions*

The success of the sugarcane culture has relied for decades on traditional breeding of varieties resistant to plagues and diseases, with increased sucrose content, and more adaptable to different soils and environmental conditions, a slow and uncertain approach. Therefore, genomic data that could assist traditional breeding in the improvement of sugarcane varieties are awaited. There are very few molecular studies on sugarcane signaling response to environmental changes, and none on the distribution of these components in the different plant tissues. The comparison of the transcript complement found in six tissues using microarrays provided a spatial picture of the transcriptome of this grass, which can greatly contribute to the assignment of function to new genes. The present work focused on the identification of genes that may participate in tissue-specific activities and ubiquitous genes. The cloning of strong ubiquitous promoters or tissue-specific promoters can increase the availability of tools for sugarcane transformation and study. The identification of genes highly expressed in stems or leaves could also help in the understanding of metabolic pathways involved in sugar production and accumulation, and could constitute targets for crop improvement. The described signaling elements are currently being studied in search for candidates that might regulate hormone responses, the accumulation of sucrose in the stalk, and the response to several biotic and abiotic stresses allowing us to step forward in the efficient manipulation of sugarcane varieties. The knowledge accumulated on the role for signal transduction processes in the regulation of stress and pathogenesis responses brings the SUCAST components to center stage in the search for genes that might be modified to obtain plants with desired traits.

## **Acknowledgments**

This work was funded by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). We are indebted to Adriana Y. Matsukuma and Denise Yamamoto for technical assistance on microarray printing and scanning performed in the laboratory of the Cooperation for Analysis of Gene Expression (CAGE) inter-departmental Project, Dr. Sergio Verjovski-Almeida and Dr. Hugo Aguirre Armelin for their support throughout the development of this work, Apuã C.M. Paquola for valuable help providing bioinformatic tools and Dr. Jesus Ferro for coordinating the SUCEST cDNA clone collection in the beginning of this work. AMdS was partially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, (CNPq). FSPT, FRR, RZNV, KCO and ACQS were supported by FAPESP fellowships.

## References

1. Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T., Sudarsanam, S. 2002a, Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.*, **27**(10), 514-520.
2. Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. 2002b, The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**(5600), 1912-1934.
3. Chen, W., Provar, N.J., Glazebrook, J., *et al*, 2002, Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, **14**(3),559-74.
4. Gribskov, M., Fana, F., Harper, J., *et al*, 2001, PlantsP: a functional genomics database for plant phosphorylation. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 111-113.
5. Rives, A.W., Galitski, T. 2003, Modular organization of cellular networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**(3), 1128-33.
6. Lin, J., Qian, J., Greenbaum, D., *et al*, 2002, GeneCensus: genome comparisons in terms of metabolic pathway activity and protein family sharing. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4574-82.
7. McCarty, D.R., Chory, J. 2000, Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell*, **103**(2), 201-209.
8. Vettore, A.L., da Silva, F.R., Kemper, E.L., *et al*, 2003, Analysis and Functional Annotation of an Expressed Sequence Tag Collection for the Tropical Crop Sugarcane. *Genome Res.*, **13**, 2725-2735.
9. Arruda, P. 2001, Sugarcane transcriptome. A landmark in plant genomics in the tropics. *Genetics and Mol. Biol.*, **24**, 1-296.
10. Souza, G.M., Simoes, A.C.Q., Oliveira, K.C., *et al*, 2001, The sugarcane signal transduction (SUCAST) catalogue: prospecting signal transduction in sugarcane. *Genetics and Mol. Biol.*, **24**(1-4), 25-34.
11. Altschul, S.F., Madden, T., Schaffer, A., *et al*, 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389–3402.
12. Sonnhammer, E.L.L., Eddy, S.R., Birney, E., Bateman, A., Durbin, R. 1998, Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 320-22.
13. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., Ponting, C.P. 1998, SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**(11), 5857-

64.

14. Saal, L.H., Troein, C., Vallon-Christersson, J., Gruvberger, S., Borg, Å. and Peterson C. 2002, Bioarray software environment: A platform for comprehensive management and analysis of microarray data. *Genome Biol.*, **3**, software0003.1-software0003.6.
15. Ihaka, R., Gentleman, R. 1996, R: A language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, **5**, 299-314.
16. Koide, T., Zaini, P.A., Moreira, L.M., *et al*, 2004, DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a non-pathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. *Journal of Bacteriology*, **186**, 5442-5449.
17. Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., *et al*, 2002, Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.*, **30**(4), e15.
18. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**(4), 402-8.
19. MacKay, D. 2003, Probability, entropy, and inference. In: *Information Theory, Inference, and Learning Algorithms*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
20. Arabidopsis Genome Initiative. 2000, Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815.
21. Obayashi, T., Okegawa, T., Sasaki-Sekimoto, Y., *et al*, 2004, Distinctive features of plant organs characterized by global analysis of gene expression in Arabidopsis. *DNA Res.* **11**(1),11-25.
22. Cho, Y., Fernandes, J., Kim, S.H., Walbot, V. 2002, Gene-expression profile comparisons distinguish seven organs of maize. *Genome Biol.*, **3**(9), research0045.
23. Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., *et al*, 2000, MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.*, **24**(4), 457-466.
24. Beisson, F., Koo, A.J.K., Ruuska, S., *et al*, 2003, *Arabidopsis* Genes Involved in Acyl Lipid Metabolism. A 2003 Census of the Candidates, a Study of the Distribution of Expressed Sequence Tags in Organs, and a Web-Based Database. *Plant Physiol.* **132**, 681–697.
25. Watson, B.S., Asirvatham, V.S., Wang, L., Sumner, L.W. 2003, Mapping the Proteome of Barrel Medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiol.*, **131**, 1104–1123.

26. Henning, L., Gruissem, W., Grossniklaus, U., Kohler, C. 2004, Transcriptional programs of early reproductive stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **135**,1765-75.
27. Zhao, D.Z., Wang, G.F., Speal, B., Ma, H. 2002, The excess microsporocytes1 gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev.*, **16**(15), 2021-31.
28. Canales, C., Bhatt, A.M., Scott, R., Dickinson, H. 2002, EXS, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.*, **12**(20), 1718-27.
29. Nonomura, K., Miyoshi, K., Eiguchi, M., *et al*, 2003, The MSP1 gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. *Plant Cell*, **15**(8),1728-39.
30. Aravind, L., Koonin, E.V. 2000, The U box is a modified RING finger- a common domain in ubiquitination. *Curr Biol.*, **10**, R132-134.
31. Azevedo, C., Santos-Rosa, M.J., Shirasu, K. 2001, The U-box protein family in plants. *Trends Plant Sci.*, **6**(8), 354-8.
32. Vierstra, R.D. 2003, The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.*, **8**(3), 135-42.
33. Bartel, B., Fink, G.R. 1994, Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**(14), 6649-53.
34. Kolomiets, M.V., Hannape, D.J., Chen, H., Tymeson, M., Gladon, R.J. 2001, Lipoygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell*, **13**(3), 613-26.
35. Porta, H., Rocha-Sosa, M. 2002, Plant lipoygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol.*, **130**(1), 15-21.
36. Inoue, K., Sewalt, V.J., Murray, G.B., Ni, W., Sturzer, C., Dixon, R.A. 1998, Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiol.*, **117**(3),761-70.
37. Selman-Housein, G., Lopez, M., Hernandez, D., *et al*, 1999, Molecular cloning of cDNAs coding for three sugarcane enzymes involved in lignification. *Plant Sci.*, **143**, 163-171.
38. Schmid, M., Uhlenhaut, N.H., Godard, F., *et al*, 2003, Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development*, **130**, 6001-6012.

39. Aukerman, M.J., Sakai, H. 2003, Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by MicroRNA and Its APETALA2-Like Target Genes. *The Plant Cell*, **15**, 2730–2741.
40. Chen, X. 2004, A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* Flower Development. *Science*, **303**, 2022-2025.

**Table I: cDNA microarray hybridizations performed with sugarcane tissue samples.** All hybridizations were performed against a reference sample (pool of tissues composed of an equimolar mixture of flower, leaf, stem, root and bud RNA). The table indicates which CyDye was used to label each sample in each different hybridization.

<i>flower</i>		<i>lateral bud</i>		<i>leaf</i>		<i>root</i>		<i>1<sup>st</sup> internode</i>		<i>4<sup>th</sup> internode</i>	
Cy3	Cy5	Cy3	Cy5	Cy3	Cy5	Cy3	Cy5	Cy3	Cy5	Cy3	Cy5
Pool vs. FL-1		Pool vs. LB-		Pool vs. LV-		Pool vs. RT-		Pool vs. IN1-		Pool vs. IN4-	
Pool vs. FL-1		Pool vs. LB-		Pool vs. LV-		Pool vs. RT-		Pool vs. IN1-		Pool vs. IN4-	
FL-1 vs. Pool		LB- vs. Pool		Pool vs. LV-		RT- vs. Pool		IN1- vs. Pool		IN4- vs. Pool	
FL-2 vs. Pool		LB- vs. Pool		LV- vs. Pool		RT- vs. Pool		IN1- vs. Pool			
				LV- vs. Pool							
				LV- vs. Pool							
				LV- vs. Pool							
				LV- vs. Pool							

**Table II. The SUCAST Catalogue.** The number of SAS in the catalogue and selected for the cDNA microarray analysis for each category are shown. For a list of all SAS refer to the Supplementary Material, table S-V.

<b>SUCAST classification</b>	<b># SAS</b>	<b># SAS in the array</b>
<b><u>Protein categories:</u></b>		
Receptors	477	181
Adapters	12	9
G proteins	17	10
Small GTPases	75	36
Two component relay	19	8
Cyclase	1	0
Calcium metabolism	68	31
Inositol metabolism	46	21
Protein Phosphatases	107	36
Protein kinases	510	65
Ubiquitination	106	41
Transcription factors	611	175
Hormone biosynthesis	75	30
Hormone related	22	13
<b><u>Functional categories:</u></b>		
Development	30	13
Cell cycle	34	10
Stress	305	119
Pathogenicity	382	104
'No matches' and unknown proteins	548	294
Others	118	84
<b>TOTAL</b>	<b>3563</b>	<b>1280</b>

**Table III. Distribution of differentially expressed and ubiquitous genes among sugarcane tissue samples.** Genes with at least 70% of replicate points outside the cutoff limits in both biological samples of one or more tissues were considered differentially expressed, whereas genes with more than 55% of replicates within the cutoff limits in all samples were considered ubiquitous. The percentage of genes with expression above, within or below the ratio cutoff limits are indicated for each sample.

tissue	sample	% of genes above	% of genes within	% of genes below	% of genes variable	Total # of SAS analyzed
flowers	FL-1	3.19%	78.59%	8.33%	9.89%	1224
	FL-2	5.00%	80.15%	6.87%	7.97%	1179
lateral buds	LB-1	1.18%	90.10%	3.47%	5.25%	1182
	LB-2	4.61%	77.30%	5.36%	12.73%	1194
leaves	LV-1	8.84%	72.50%	9.98%	8.67%	1222
	LV-2	7.36%	76.05%	9.13%	7.46%	1073
roots	RT-1	5.52%	80.46%	7.31%	6.71%	1177
	RT-2	11.78%	61.33%	10.46%	16.43%	1205
internodes	IN1-1	3.91%	86.34%	4.58%	5.16%	1201
	IN1-2	6.20%	69.31%	5.80%	18.69%	1225
	IN4-1	4.40%	88.33%	1.91%	5.36%	1045
	IN4-2	8.26%	54.57%	10.77%	26.40%	1235
Average		5.87%	76.02%	7.05%	11.05%	1180

**Table IV. SUCAST SAS showing differential expression among different sugarcane tissues.** The table lists all SAS that are found enriched or lacking in both biological samples of the various tissues. The data corresponds to the results of at least eight replicate points for each of the SAS. The plus sign indicates that the SAS expression is higher in the tissue than observed in the pool, while the minus sign indicates that the SAS expression is lower in the tissue than in the pool.

SAS	Putative cellular function	flower	lateral bud	leaf	root	internode 1	internode 4
SCCGRZ2001F07.g	Calmodulin-binding protein			+			
SCCCLL2001B01.b	Apyrase		+	-			
SCCGRZ2001H06.g			+	-			
SCZEL1012F10.g	GNCG calmodulin-binding protein	+					
SCCGRZ1003A03.g	HSP70s (heat shock protein)			-			
SCCPLR1051D05.g	Calreticulin			-	-		
SCRFLR2037F09.g	Calreticulin			-	-		
SCPESD1069D02.g	Calreticulin			-	-		
SCQERT2090E04.g	Calreticulin			-	-		
SCRJLR1020D11.g	Fructose-bisphosphate aldolase		+	-			
SCCGRZ2001F03.g	Fructose-bisphosphate aldolase		+	-			
SCULTR1059C02.g	Cytein III	-	-	+	-		
SCRLLR1038H01.g	Zeaxanthin epoxidase (ABA2)		+				
SCLLLR1011C06.g	Zeaxanthin epoxidase (ABA2)		+				
SCRFLR1012D12.g	Nitrilase - Auxin biosynthesis	-	-	+	-		
SCCCLL6002B05.g	Nitrilase - Auxin biosynthesis	-	-	+	-		
SCEZHR1047G06.g	Nitrilase - Auxin biosynthesis	-	-	+	-		
SCQERT1028H06.g	Nitrilase - Auxin biosynthesis	-	-	+	-		
SCVPLR2012A10.g	ACC oxidase - Ethylene biosynthesis		+				
SCCFFR1055C11.g	ACC oxidase - Ethylene biosynthesis	-					
SCCGLL6007B03.g	ACC synthase - Ethylene biosynthesis			+			
SCSBAM1085B06.g	Lipoic acid desaturase - Jasmonic acid biosynthesis	-	+				
SCULTR2030B03.g	Lipoxygenase - Jasmonic acid biosynthesis		+				
SCCORT1001E01.g	Lipoxygenase - Jasmonic acid biosynthesis		+				
SCJFRT1007H07.g	Lipoxygenase - Jasmonic acid biosynthesis	-	+				
SCQERT1024E12.g	Phenylalanine ammonia-lyase (SA biosynthesis)		+	-			
SCSGAM1094D05.g	Phenylalanine ammonia-lyase (SA biosynthesis)		+				
SCCCLL2002F08.g	Auxin repressed dormancy-associated		+		+		
SCRLLR1038D05.g	Jasmonate responsive protein	-	+	+			
SCRFLR1001E04.g	Rubisco - small subunit		+				
SCRFLR1012F12.g	Caffeoyl acid 3-O-methyltransferase		+		+		
SCCCLR10102F07.g	Myo-inositol-1-phosphate synthase	-	-				
SCSBFL1109C05.g	Cyclopropane fatty acid synthase						
SCACLRL1126E09.g	No match	-	+	-			
SCBPSD2038H10.g	No match		+				
SCBFS1336A06.g	No match		+				
SCCFLR1001D09.g	No match		+				
SCRFLR1309C03.b	No match		+				
SCSBS1051A09.g	No match		+				
SCCCLL1001H07.b	No match		+				
SCAGLR2026G12.g	No match		+				
SCRFLR2034D09.g	No match	-	+				
SCRFLR2056A06.g	No match		+				
SCCCLR1066B12.g	No match		+				
SCBGLR1023G07.g	No match		+		+		
SCCCLR2001E10.g	No match		+		+		
SCCCLL3004C02.b	No match		+		+		
SCRJAD1063D03.g	No match		+		+		
SCJFST1012G07.g	No match	-					
SCRJFL1022F09.g	No match (non-coding)	-	-	-	-		
SCRLLR1111D02.g	No match (non-coding)	-	-	-	-		
SCRJFL1017D09.g*	No match	-	-	-	-		
SCMCA1101G01.g	No match	-	-	-	-		
SCUTAM114F04.g	No match	-	-	-	-		
SCCFFR1008H11.g	No match	-	-	-	-		
SCCCLL4007H07.g	No match	-	-	-	-		
SCCCLR1091A10.g	60S Ribosomal protein L23						
SCULTR1037F12.g	60S Ribosomal protein L5						
SCACLRL2022H05.g	Acyl carrier protein-like						
SCCGRZ2002C09.g	Alpha tubulin						
SCSBAD1084C01.g	Alpha 2 tubulin						
SCBFA1045D12.g	Beta-D-glucosidase						
SCCCLR1022F10.g	Citric acid hydrosymethyltransferase	-	-	-	-		
SCCCLR2002D04.g	Histone H4						
SCCCLR2002G09.g	Histone H4						
SCCGRZ2001F06.g	60S ribosomal protein						
SCPEAM2015H01.g*	ATP-dependent DNA helicase					+	
SCCCLR2002E04.g	Bet v1 pollen allergen	+					
SCCORT2001A03.g	Homeodomain protein		+				
SCCORT2002B03.g	Ribosomal protein		-				
SCCCLR1067A05.g	Sugar transporter		+				
SCRUSB1062E12.g	Tracylglycerol lipase		-				

\* SAS identity not verified by re-sequencing

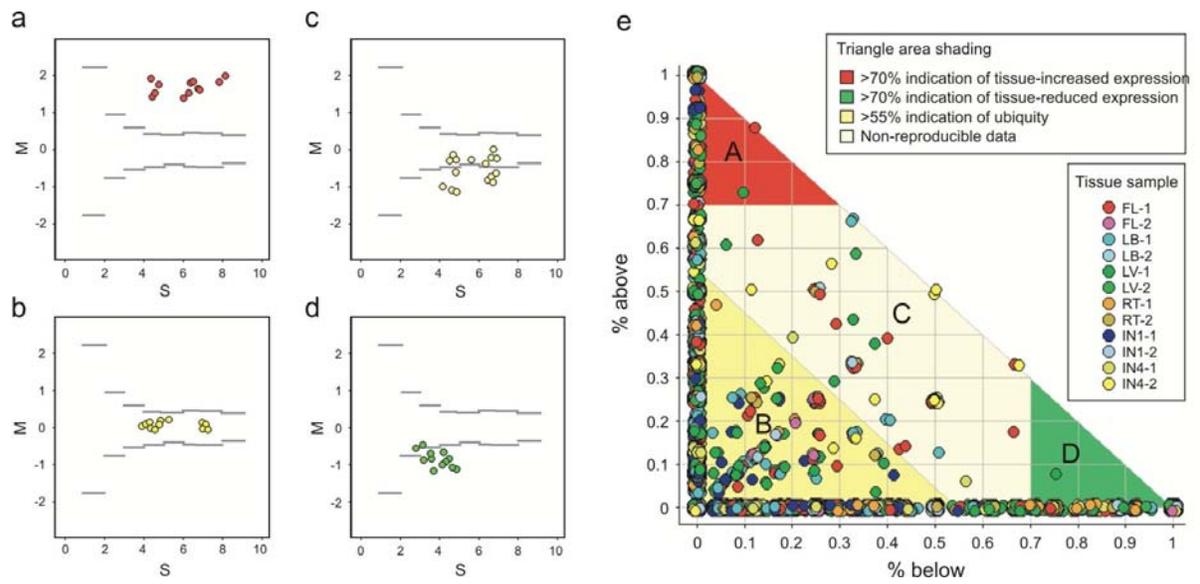
SAS	Putative cellular function	flower	lateral bud	leaf	root	internode 1	internode 4
SCCGRZ1002H08.g	Sapoin B domain-containing protein				+		
SCPEFL1043F03.g	WD40 protein			-			
SCCSDS2001E05.g	Thaumatin			-		-	
SCCSDS1003E02.g	Thaumatin			-		-	
SCVPRZ2003H07.g	R-gene Mlo			+	-		
SCCCLL3080A08.g	R-gene - NBSLRR			+			
SCRCLAD1098H03.g	R-gene - NBSLRR			+			
SCBFA1089A09.g	R-gene - NBSLRR			+			
SCOSRZ3038H06.g	R-gene - NBSLRR				+		
SCCCLR1065F03.g	R-gene - NBSLRR	-				+	
SCCCLR1023D05.g	R-gene transcription - lect1				-	+	
SCCORT1028C02.g	Pathogenicity - PR protein	-	-	-	-		
SCCORT1038D03.g	Pathogenicity - PR protein	-	-	-	-		
SCACLR1038B06.g	Protein kinase/CBL-interacting		+				
SCCORT2098H01.g	Protein kinase - CDPK		+				
SCCGLR1018F05.g	Protein kinase - CDPK		+				
SCCCLL4001E05.g	Protein kinase - GSK3-like			-			
SCCGRZ1003E02.g	Protein kinase - MAPK		+				
SCCORT2064G11.g	Protein kinase - MAPK		+			+	
SCJLST1025A09.g	Protein kinase - cAMP dependent				-		
SCCCLR1076F09.g	Protein kinase - SS/ribosomal-like						
SCPEPRZ1010E06.g	Protein Phosphatase - 2C			-			
SCMCCCL6048A12.g	Protein Phosphatase 2A				+		
SCCERZ3052A09.g	Protein Phosphatase 2A				-		
SCMCS1051F08.g	Dual Specificity Protein Phosphatase (DSPP)		+				
SCSBHR1056H08.g	Ethylene receptor EIN2		+	-		+	
SCJFST1017H03.g	Receptor - NPH1-like			-			
SCRJAD1133D10.b	Photoreceptor - blue light - cry1			+			
SCAGST1318B05.g	Photoreceptor - blue light - cry1			+			
SCJFZR2027C05.g	Receptor - Cleistanol			-			
SCBGLFL0808E07.g	EXS receptor kinase		+				
SCCERZ1012E03.g	Leucine-rich transmembrane kinase (LTK1)		-	-			
SCOSAM2100F06.g	Leucine-rich transmembrane kinase (LTK1)		-	-			
SCAGLR1021B11.g	Receptor Ser/Thr kinase		+				
SCOSLR1061E06.g	Receptor Ser/Thr kinase		+				
SCSGAD1006D03.g	Receptor Ser/Thr kinase		+				
SCCGRZ1006D10.g	Receptor Ser/Thr kinase		+		-	+	
SCPEZAM2058E08.g	Receptor Ser/Thr kinase		+		-	+	
SCJLST1020G08.g	Receptor Ser/Thr kinase		+		-	+	
SCSBAM1086H09.g	Receptor Ser/Thr kinase		+		-	+	
SCPEPLR1030G10.g	Receptor Ser/Thr kinase		+		-	+	
SCJFRT1009B11.b	Receptor Ser/Thr kinase		+		-	+	
SCVPLC6041G02.g	Receptor Ser/Thr kinase		-	-			
SCCCLR1023E12.g	Receptor Ser/Thr kinase		-	-			
SCVPLR2003F07.g	Receptor Ser/Thr kinase		-	-			
SCJLRZ1021D12.g	Receptor Ser/Thr kinase		-	-			
SCCORT1028G10.g	Receptor Ser/Thr kinase with lectin domain		+				
SCCCLL3120C09.g	Receptor Ser/Thr kinase with LysM domain		+		+		
SCCGRZ2003C02.g	Receptor - Somatic embryogenesis		+				
SCMCS1053A06.g*	Receptor - Somatic Embryogenesis		+				
SCCQST1031D02.g	Receptor - Somatic embryogenesis		+				
SCBFSB1048C08.g	S-receptor	-	+				
SCPEAM1017E02.g	Wall-associated Ser/Thr kinase receptor		+				
SCCORT2001H11.g	Small GTPase - Arf				+		
SCCCLR1068D10.g	Small GTPase - Arf				+		
SCJLRT1019H05.g*	Small GTPase - Arf				+		
SCCORT1001E12.g	Small GTPase - Rab		+				
SCBGLR1117A05.g	Small GTPase - Ran		-	-			
SCCADC1004H02.g	Catalase		-	-	-		
SCCGRZ2066D05.g	Cytochrome P450			+			
SCJLRZ1024A03.g	Cytochrome P450			+			
SCCJFR1035E08.b	Cytochrome P450 - CYP71C	-	-	-	+		
SCCGRZ2004A02.g	Cytochrome P450 - CYP71E				+		
SCCSCAM2001B04.g	Cytochrome P450 - CYP71E				+		
SCAGLR1064G02.g	Cytochrome P450 - CYP73				+		
SCSGFL4193B05.g	Cytochrome P450 - CYP73				+		
SCAGLR1043E04.g	Cytochrome P450 - CYP74A				+		
SCCORT1028H08.g	Cytochrome P450 - CYP75		+				
SCMCA10264B09.g	Cytochrome P450 - CYP75		+				
SCCERZ1012A02.g	Cytochrome P450 - CYP90		+		-	+	
SCJLBR1073E08.g	Dioxygenase	-	-	+			
SCJLFR1074E10.g	Cysteine proteinase precursor		+	+			

SAS	Putative cellular function	flower	lateral bud	leaf	root	internode 1	internode 4
SCAGLR2011H07.g	Thioredoxin		-				+
SCRFLR1056D04.g	Thioredoxin		-				+
SCRFLR1013A09.g	Thiol protease						
SCCCAD1001C08.g	Peroxidase - P7X					+	
SCCGRZ1002F06.g	Enolase				-		+
SCCCLL2001G03.b	Histone deacetylase (HOS1-like)				-		+
SCUTS13084F06.g	Stress related/Low temperature induced (LTI)				-		+
SCACC16008H06.g	Stress related/Low temperature induced (LTI)				-		+
SCSBS1309E10.g	Aquaporin (tonoplast intrinsic protein)				-	+	
SCCORT2100B02.g	Aquaporin (tonoplast intrinsic protein)				-	+	
SCCCLR1024C03.g	Aquaporin (tonoplast intrinsic protein)				-	+	
SCJLRL4186B12.g	Aquaporin (tonoplast intrinsic protein)				-	+	
SCCOST3001H12.g	Aquaporin (tonoplast intrinsic protein)				-	+	
SCCGLR1085F11.g	Dehydrin				-	+	
SCCZS1314E09.g	Glutathione S-transferase				-	+	
SCAGFL1089C03.g	Glutathione S-transferase				-	+	
SCCCLL3002C09.b	Glutathione S-transferase				-	+	
SCJLRT1020A09.g	Glutathione S-transferase				-	+	
SCJLHR1028C12.g	Histone H4				-	-	
SCSFRH1043C09.g	S-adenosylmethionine synthase				-	-	+
SCMCLR1122E10.g	NADPH-ferrihemoprotein reductase				-	+	
SCJLRL1011F11.g	Acyl-coA-oxidase				-	+	
SCJLRT1021D12.g	Chalcone synthase				-	+	
SCVPLR2002D02.g	Chalcone synthase				-	+	
SCJLRT2002B12.g	Fatty acid desaturase				-	+	
SCCCLR1070D02.g	Photosystem II oxygen-evolving enhancer (wound-induced)				-	+	
SCCCLL3004C07.b	Transcription factor - ABL3/VP1				-	+	
SCCFLR1020B12.g	Transcription factor - Alfin-like				-	+	
SCCCLR1079A06.g	Transcription factor - Alfin-like				-	+	
SCCGRZ1001G10.g	Transcription factor - AuxIAA				-	+	
SCVPL1132B06.g	Transcription factor - AuxIAA				-	+	
SCRJLR2041C03.g	Transcription factor - GARP				-	+	
SCRJLAM1010D08.g	Transcription factor - knotted homeobox				-	+	
SCCCLR1066C06.g	Transcription factor - HSF				-	+	
SCCGRZ3002D03.g	Transcription factor - LIM				-	+	
SCPEPRZ1008F02.g	Transcription factor - LIM				-	+	
SCCFLR3003A11.g	Transcription factor - MADS				-	+	
SCSGS1007G01.g	Transcription factor - MADS			+	-		
SCCCLR2003H07.g	Transcription factor - MADS				-	+	
SCSBS1032G02.g	Transcription factor - MADS				-	+	
SCCCLR1008G10.g	Transcription - Myb/LHY/CA1				-	+	
SCCCLR2003E10.g	Transcription factor - NAM				-	+	
SCRJLCL6032B05.g	Transcription factor - NAM				-	+	
SCPEPLR1042D02.g	Transcription factor - NAC				-	+	
SCCERZ1201E05.g	Transcription factor - NAC				-	+	
SCCCLR10224F10.g	Transcription factor - Auxin responsive				-	+	
SCCCLR1001D10.g	Transcription factor - AP2-domain				-	+	
SCULTR2002G02.g	Transcription factor - WRKY				-	+	
SCUTHR1065C05.g	Transcription factor - Zinc finger/ C2C2 / YABBY				-	+	
SCCGLR3031C01.g	Transcription factor - Zn finger C3H				-	+	
SCCERZ1017C07.g	Pumilio - Translation				-	+	
SCCCLR1077F09.g	Response regulator (ARR-like)				-	+	
SCCCLR1057G02.g	Response regulators (ARR-like)				-	+	
SCCPR12008B03.g	Response regulators (ARR-like)				-	+	
SCVPLC6041F12.g	Ubiquitin-specific protease				-	+	
SCSBR1401F05.g	Ubiquitin-conjugating enzyme E2				-	+	
SCCCLR2041E12.g	Ubiquitin-conjugating enzyme E2				-	+	
SCCCLR1007A06.g	Ubiquitin-conjugating enzyme E2				-	+	

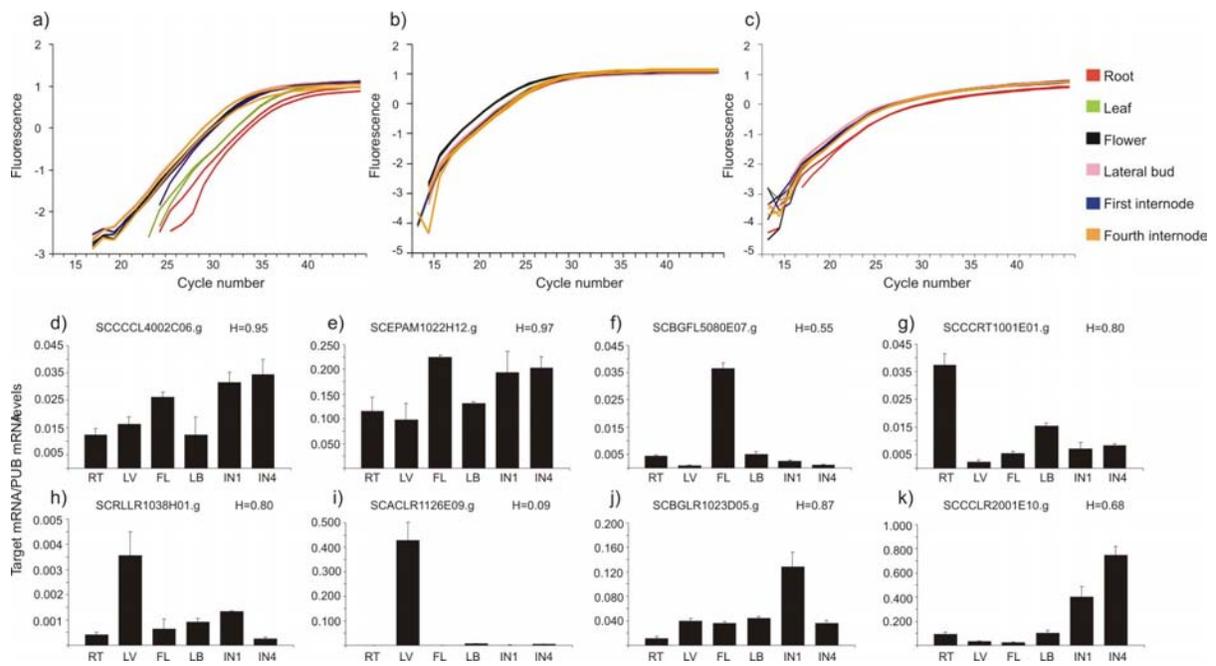
## Figure legends

**Figure 1. Differential expression consistency.** a through d - Normalized log ratios against log average intensity plots, where  $M = \log_2(\text{Cy5} / \text{Cy3})$ , and  $S = \log_2(0.5 * (\text{Cy5} + \text{Cy3}))$ . The graphics correspond to examples of the data distribution of the technical replicates for a gene we considered to have tissue-increased expression (a), ubiquity or no differential expression (b), low-reproducibility (c), or tissue-reduced expression (d). The bars indicate the intensity-dependent cutoffs. E - Global distribution of SUCAST microarray data. The position of each dot in the triangle relates to the percentage of reproducible replicates in each hybridization. The areas A, B, C and D contain data as exemplified in the corresponding graphics a, b, c and d.

**Figure 2. Validation of microarray results using real-time PCR.** a through c - Raw values of the  $\log_{10}$  fluorescence were plotted against the cycle number for a tubulin gene (a), a polyubiquitin gene (b) and a 14-3-3 gene (c). Each tissue analyzed is represented by a different color. All the reactions were carried out in parallel and each reaction was performed in duplicates. d through k - Real-time PCR results for a Phosphatase - PP6 / catalytic subunit (d), a Cytochrome P450 - CYP71A (e), an EXS receptor kinase (f), a Lipoxygenase (g), a Zeaxanthin epoxidase (h), SCACLR1126E09.g (no match) (i), LSD1 gene (j) and SCCCLR2001E10.g (no match) (k). The bars show target mRNA levels relative to the polyubiquitin mRNA. RT = root, LV = leaf, FL = flower, LB = lateral bud, IN1 = first internode, IN4 = fourth internode. The measured entropy (H) for each distribution obtained is indicated. Error bars were calculated as described by Livak and Schmittgen<sup>18</sup>.



**Figure 1**



**Figure 2**

## ***Capítulo II***

---

### ***Expression Profile of Signal Transduction Components in a Sugarcane Population Segregated for Sugar Content***

**Juliana de Maria Felix**, Flávia Stal Papini-Terzi, Flávia Riso Rocha, Ricardo Zorzetto Nicolliello Vêncio, Renato Vicentini, Milton Nishiyama-Jr, Eugênio César Ulian, Gláucia Mendes Souza, Marcelo Menossi

*Plant and Cell Physiology*, aceito.

**Running title:** Signal transduction analysis in sugarcane

**Corresponding author:** Marcelo Menossi

Center for Molecular Biology and Genetic Engineering

State University of Campinas

P.O.Box 6010, 13083-875, Campinas, SP, Brazil.

Telephone number: (+55) (19) 3788-1143

Fax Number: (+55) (19) 3788-1089

E-mail: menossi@unicamp.br

**Subject areas:** Gene structure and expression

**Number of black and white figures, color figures and tables:** 4 white figures and 1 table.

## **Expression Profile of Signal Transduction Components in a Sugarcane Population Segregated for Sugar Content**

**Juliana de Maria Felix**<sup>1,2\*</sup>, Flávia Stal Papini-Terzi<sup>3\*</sup>, Flávia Riso Rocha<sup>3</sup>, Ricardo Zorzetto Nicoliello Vêncio<sup>3</sup>, Renato Vicentini<sup>1,2</sup>, Milton Nishiyama-Jr<sup>3</sup>, Eugênio César Ulian<sup>4</sup>, Gláucia Mendes Souza<sup>3</sup>, Marcelo Menossi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Functional Genomics Laboratory, Center for Molecular Biology and Genetic Engineering, State University of Campinas, P.O.Box 6010, 13083-875, Campinas, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Genetics and Evolution, Institute of Biology, State University of Campinas, P.O.Box 6010, 13083-875, Campinas, SP, Brazil..

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>4</sup> Cane Technology Center – CTC, 13400-970, Piracicaba, SP, Brazil.

\*The first two authors contributed equally to this work.

## **ABSTRACT**

Sucrose is the major product of photosynthesis in many higher plants. It is transported from the source tissue through the phloem to various sink tissues to support plant growth, development and reproduction. Knowledge of the signal transduction pathways involved in sucrose synthesis is limited. Genes involved in the regulation of sucrose synthesis and accumulation could be used as tools in the development of genetically manipulated plants with higher sucrose content or aid in breeding programs as molecular markers. Using the SUCEST (Sugarcane EST) database information and a microarray approach, the expression profiles of 1920 sugarcane (*Saccharum* spp.) genes encoding signal transduction elements, transcription factors and stress-related proteins were analyzed. In order to assess their involvement in sucrose metabolism, the expression profiles of individuals from a sugarcane population segregated for sugar content were compared. From a population of 500 F1 individuals, the seven with the highest and the seven with the lowest sugar contents were selected, pooled and profiled using cDNA microarrays. Twenty-four genes were identified as differentially expressed. Five of them were more expressed in the plants with the highest sugar contents and 19 in the plants with the lowest sugar contents. RNA-blot hybridization was used to validate the expression profiles obtained for individuals in each group. These genes were shown to have differential expression throughout the growing season and in the different tissues. Our data supports the view that sugar levels modulate a complex signal transduction network that seems to involve responses related to stress.

**Keywords:** Signal transduction, sugarcane, sucrose synthesis, microarray

## INTRODUCTION

The tropical crop sugarcane is of great economic interest, contributing to about two thirds of the world's raw sugar production (Pessoa Jr. et al, 2005). Due to its unique capacity of storing sucrose in the stems, sugarcane is an interesting model for studies on sugar synthesis, transport and accumulation. Sucrose metabolism components and regulators are likely to be key players in determining sugarcane sucrose yield (Moore, 2005; Lunn et al, 1999).

Sugarcane is a complex polyploid grass with commercial varieties derived from conventional breeding. Recent yield data indicate that such technology may be reaching its limit with respect to increases in sugar productivity. It would be highly advantageous to have genes associated with desirable traits targeted for directed improvement of the varieties. A useful strategy for target-gene identification has been denominated "genetical genomics". First introduced by Jansen et al, (2001), this method aims to apply large-scale analysis of gene expression to a segregated population. The use of cDNA microarrays to evaluate an F1 sugarcane population that segregates for a certain trait may provide more insight into plant signaling and gene function than classical mutagenesis studies (Meyers et al, 2004). Recently, Casu et al (2005) used this strategy to identify genes associated with high sucrose accumulation. The genomics approach has been the method of choice in the search for coarse regulatory mechanisms of sugarcane sucrose accumulation (Carson and Botha, 2002; Carson et al, 2002; Casu et al, 2003; 2004; 2005). However, the studies on the sugarcane transcriptome have focused primarily on the sugarcane stem during vegetative growth, i.e., on internodes actively accumulating sucrose. There are no studies indicating genes potentially involved in the sugar signaling that regulates sucrose synthesis.

A comprehensive sugarcane EST (Expressed Sequence Tags) data collection was made available by the SUCEST Consortium in 2003 (Vettore et al, 2003) - <http://sucest.lad.ic.unicamp.br/public>) and functional characterization of molecular components is underway ([www.sucest-fun.org](http://www.sucest-fun.org)). Elements of signaling cascades, transcription factors and stress-related transcripts, in particular, are the focus of this work and have been described previously (Souza et al, 2001; Papini-Terzi et al, 2005). Sugars act as signaling molecules in plants, affecting a variety of physiological processes, such as

photosynthesis, source and sink metabolism and defense responses (Smeekens, 2000; Rolland et al, 2002; Koch, 2004). Metabolism control involves the coordinated regulation of genes and enzymes at the level of transcription, translation, post-translational modification and protein turnover. The carbon metabolite signaling pathways cross-talk with other pathways, including hormonal responses, cell cycle control and nitrogen response systems, amongst others (Halford and Paul, 2003). Whereas the effect of sugars on gene regulation is well established, the nature of the signals and the molecular mechanisms involved in sugar perception and intracellular signal transmission are largely unknown. Therefore, understanding sucrose synthesis in sugarcane at the transcriptional level, and finding the genes coding for proteins associated with sugar accumulation would be of great value for the long-term success of varietal improvement.

In this study, the expression profile of 1920 sugarcane genes related to signal transduction in a sugarcane population segregated for sugar content were analyzed and putative targets for molecular-assisted varietal improvement identified.

## RESULTS

### *Sugar content in a field-grown F<sub>1</sub> segregant progeny*

In order to assess differences in gene expression associated with sugar content, individuals from sugarcane progeny contrasting for sucrose content were chosen for the analysis. The plant material used was a field-grown F<sub>1</sub> progeny selected from a cross between the sugarcane varieties SP 80-180 and SP 80-4966. From a total of 500 individuals, seven plants with the highest (7HS) and seven with the lowest (7LS) sugar contents were picked out. Figure 1 shows the average values and standard deviations for the soluble solids contents (Brix) of the most mature internodes of these two groups of plants throughout the growing season (6, 7, 9, 11 and 13 months after planting).

### *Differential gene expression in mature sugarcane leaves*

A set of sugarcane cDNA microarrays previously described by Papini-Terzi et al, (2005) was used to assess the gene expression of the mature leaves. 1920 ESTs involved in sugarcane signal transduction were represented on the glass slides. Target RNA was isolated from the mature leaf tissue of the 7HS and 7LS pools, reverse-transcribed into complementary DNA, fluorescently labeled, and competitively hybridized onto replicate slides. Leaves were collected nine months after planting since at this age the great difference in sugar content was observed between the two segregant samples (Figure 1). Twenty-four ESTs were differentially expressed in the two populations. The putative biological functions associated with these ESTs are shown in Table 1. Five transcripts were enriched in the mature leaves of the higher sugar content plants. These encoded an omega-3 fatty acid desaturase (FAD8), two sequences with no hits in the public databases ('no match'), a putative receptor-like serine/threonine kinase (RLK1) and a Myb domain transcription factor LHY/CCA1. Nineteen transcripts were enriched in the mature leaves of the lower sugar content plants. These encoded three 14-3-3-like proteins, two proteins of the inositol metabolism (o-methyltransferase and 1,4,5-trisphosphate phosphatase), an SNF1-related protein (SNRK1), a putative protein with an unknown function, eight stress-related proteins, two transcription factors, an F-box TIR-1 and one putative protein with no match in the GenBank database.

It is interesting to note that cellular components of various functional categories, including signaling (RLK1, SNRK, 14-3-3), transcription (tubby, DP transcription factor) and stress responses (drought and cold response, wound induced protein, dehydrin, tonoplast intrinsic protein) were found differentially expressed. This indicates that the modulation of sucrose content relies on several metabolic processes, including the perception of stress signals and regulation of gene expressions.

*Gene expression validation by RNA-blot and analysis in plants throughout the growing season*

Four genes with greater expression in the higher sugar content plants (*SCSBAM1085B06.g*, *SCACLR1126E09.g*, *SCEQRZ3020C02.g* and *SCCCLR1C08G10.g*) and three with increased expression in the lower sugar content plants (*SCSBST3096H04.g*, *SCEQLB2019B08.g* and *SCQGLR1085F11.g*) were analyzed in more detail by RNA-blot using total RNA from three sugarcane individuals to provide replication for gene expression trends. Figure 2 shows that the microarray data was confirmed in at least two of the three independent samples collected nine months after planting, indicating high consistency between the two data sets.

To identify the gene expression trends throughout the growing season, the mRNA levels for the same seven genes were determined in the 7HS and 7LS pools collected 6, 7, 9, 11 and 13 months after planting (Figure 3). The inset graph represents the expression profile of each gene plotted for each population. The four genes found to be enriched in the higher sugar content plants were consistently differentially expressed throughout the growing season (Figure 3 a-d). These genes are possibly involved in the control of sucrose synthesis, accounting for the higher sugar content in these segregant plants. The genes with more transcripts in the lower sugar content plants showed a less consistent pattern (Figure 3 e-g). All of them were differentially expressed in the plants at nine months after planting, confirming the expression observed by microarrays, but only the one encoding dehydrin, a stress-related protein (Figure 3g) had a more consistent pattern throughout the growing season.

Finally, the spatial profile of these ESTs was analyzed, comparing their expression in the source (mature leaf) and sink (immature leaf, immature internode, root, lateral bud

and flower) tissues of a commercial sugarcane variety (Figure 4). *SCSBAM1085B06.g* mRNA accumulated at high levels in immature leaves and immature internodes, at a lower level in mature leaves and at very low levels in roots, lateral buds and flowers. *SCEQRZ3020C02.g*, *SCACLR1126E09.g*, and *SCSBST3096H04.g* presented similar patterns, with preferential expressions in mature leaves and no expression, or a very weak signal, in the other tissues analyzed. *SCCCLRIC08G10.g* was expressed in all tissues analyzed, but its mRNA accumulated at high levels in mature and immature leaves, lateral buds and flowers. *SCEQLB2019B08.g* and *SCQGLR1085F11.g* showed similar behavior, their expression levels being highest in immature leaves, immature internodes, lateral buds and flowers.

## DISCUSSION

Photosynthesis is primarily active in mature leaf mesophyll cells, and photosynthate, mainly in the form of sucrose, is transported to the meristems and developing organs. In sugarcane, young growing leaves and stems are the main sink tissues. Light and sugars regulate growth activities by a coordinated modulation of gene expression and enzyme activities in both carbohydrate-exporting (source) and carbohydrate-importing (sink) tissues. Gene regulation is based on sensing different signals or stimuli, which are transmitted through a signaling pathway, finally leading to an increase or decrease in transcription. In sugar signaling, the first step is to sense the nature and level of the specific sugar. While elevated cellular levels of sugar up-regulate genes involved in the synthesis of polysaccharides, storage proteins and pigments, as well as in genes associated with defense responses and respiration, sugar deprivation enhances the expression of genes involved in photosynthesis and resource remobilization, such as the degradation of starch, lipid, and protein (Koch, 1996; Yu, 1999; Ho et al, 2001). Although the regulatory effect of sugars on photosynthetic activity and plant metabolism has long been recognized, the concept of sugars as central signaling molecules is relatively new (reviewed by Rolland et al, 2002).

Price et al (2004) used DNA microarray analysis to determine the effect of glucose and inorganic nitrogen on gene expression on a global scale in *Arabidopsis thaliana*. Glucose regulated a broad range of genes, including genes associated with carbohydrate metabolism, signal transduction and metabolite transport. In addition, a large number of stress responsive genes were also induced by glucose, indicating a role for sugar in environmental responses. Similar results were obtained using rice (*Oryza sativa*) cell cultures, where the transcription rate and mRNA stability were shown to be affected by sugars (Ho et al, 2001), illustrating a diverse role of sugar in gene regulation. A recent microarray study measuring the effects of sucrose and light on 8000 unique *Arabidopsis* targets revealed that genes associated with metabolism, protein synthesis/modification and energy were over represented when compared to genes unaffected by the treatments (Thum et al, 2004).

In this study cDNA microarrays were used to assess the expression profile of the sugarcane genes involved in signal transduction in plants segregated for sugar content. The use of “genetical genomics” (Jansen and Nap, 2001) allowed for the identification of

genes whose differential expression levels correlated with high or low sugar contents in a segregated sugarcane population. Microarrays containing 1920 signal transduction-related ESTs, as well as transcription factors and stress-related elements, were used to measure relative gene expression. A total of 24 SAS were defined as differentially expressed. Five of them were found to be differentially expressed in a high sugar content pool of plants and the other 19 in a low sugar content pool.

### ***Gene expression profile analysis associated with high sugar content***

#### *Cross-talk between hormone biosynthesis and sugar signaling*

One of the five ESTs up regulated in high sugar content (HS) mature leaves coded for an omega-3 fatty acid desaturase-*FAD8* (*SCSBAM1085B06.g*) (Table 1). In higher plants, the membrane lipids contain a high proportion of trienoic fatty acids (TAs). It has been suggested that these fatty acids, especially linolenic acid, are precursors of a defense-related signal molecule, jasmonate (JA). In *Arabidopsis*, three genes encoding the omega-3 fatty acid desaturase, namely *FAD3*, *FAD7* and *FAD8*, are responsible for the production of TAs. Environmental stimuli, such as wounding, salt stress and pathogen invasion, which lead to a rapid increase in JA production, significantly induce the expression of the *FAD7* and *FAD8* genes (Nishiuchi et al, 1998). The sugarcane gene *FAD8* was enriched in the high sugar content individuals nine months after planting (Figure 2), and was always more expressed in these plants throughout the growing season (Figure 3). This EST was more expressed in immature leaves and also had high levels in immature internodes, which are considered as sink tissue, but also presented a weak expression in mature leaves (Figure 4). The data point to a role of JA synthesis in sucrose metabolism. This is the first report of the involvement of this gene in sucrose synthesis, but additional studies will be necessary to elucidate how jasmonate may be acting.

#### *The possible involvement of the receptor-like protein kinase in sugar sensing*

Recent evidence suggested that plants have many different types of receptor-like protein kinases (RLKs) that may transduce extra cellular information into the cell. One sugarcane EST encoding for a RLK (*SCEQRZ3020C02.g*) was found to be enriched in the

high sugar content individuals nine months after planting (Figure 2) and was always more expressed in these plants throughout the growing season (Figure 3). RLKs have been identified from a number of plants and have been categorized into classes based on the different structural motifs found in their extra cellular domains. The physiological functions of most RLKs are unknown, but some of them are involved in disease resistance and plant development (Becraft et al, 2002). To study the metabolic interactions between the mesophyll and bundle-sheath cells in sorghum, a C4 plant, Annen and Stockhaus (1999) cloned and characterized protein kinases that could be involved in the regulatory processes and signal transduction of this metabolic pathway. One of these was an *RLK1* that accumulated at much higher levels in the mesophyll cells than in the bundle sheath cells, and was almost undetectable in the roots. As in sorghum, the sugarcane *RLK* transcripts were almost undetectable in the roots or in any other sink tissue, but accumulated differentially in mature leaves (Figure 4), which have photosynthetic active cell types. *In situ* analyses showed that transcripts of the sugarcane *RLK* were preferentially expressed in the bundle-sheath cells of mature leaves (Felix et al, unpublished data). It is known that receptor-like protein kinases are responsible for the activation of other factors that are translocated to the nucleus to induce gene expression changes (Hardie, 1999). This suggests that the sugarcane *RLK*, a bundle-sheath cell specific protein kinase, could be involved in cellular signaling cascades mediated by abundant sugar levels in sugarcane mature leaves.

#### *Putative activation of SPS by the circadian clock*

An EST homologous to a single Myb-repeat transcription factor, named CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED (CCA1) or LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) (*SCCCLR1C08G10.g*), was up regulated in HS mature leaves (Table 1). CCA1/LHY and the TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1) are thought to participate in a negative feedback loop, which is part of a model for the central oscillator in the *Arabidopsis* circadian clock. In higher plants the circadian clock controls hypocotyl elongation, daily leaf movements, flowering time and the rhythm of CO<sub>2</sub> fixation (McClung, 2001). A sugarcane LHY/CCA1 was found to be enriched in the high sugar content individuals (Figure 2) and this expression profile was also observed throughout the growing season (Figure 3). In tomato, Jones et al, (1997) demonstrated that the circadian

rhythm controls the timing of sucrose-phosphate synthase phosphatase activity, which, in turn determines the activation of sucrose phosphate synthase (SPS). SPS catalyses the conversion of UDP-glucose and fructose-6-phosphate to sucrose-6-phosphate, the second to last step in sucrose biosynthesis (Huber and Huber, 1996). Pathre et al, (2004) demonstrated that the diurnal variation observed in the activity of SPS was not due to any intrinsic rhythm, but due to the transient changes in environmental conditions, like irradiance and temperature. When the circadian clock was correctly tuned with the environment, *Arabidopsis* plants presented increased photosynthesis and growth (Dodd et al, 2005). The sugarcane EST was mainly expressed in mature and immature leaves, lateral buds and flowers, but also presented a weak expression in immature internodes and roots (Figure 4). The hypothesis was raised that the expression profile of *LHY/CCA1* transcripts in HS plants could be related to a photosynthetic advantage and, consequently, an enhanced carbon fixation. *LHY/CCA1* may control the transcription of a protein phosphatase that subsequently activates the SPS enzyme, increasing sucrose synthesis.

### ***Expression profile analysis associated with low sugar content***

#### *Putative model for sugar starvation regulation of SPS*

Three ESTs coding for 14-3-3 proteins (*SCCCRZ1001D02.g*, *SCEQRT1025D06.g* and *SCEQRT1031D02.g*) were found to be differentially expressed in mature leaves from the LS population (Table 1). Recent reports have pointed out the importance of these adapter proteins in plant metabolic pathways (Ferl, 2004). It was suggested that the members of this family affect nitrate fixation by regulating nitrate reductase (NR) and carbohydrate metabolism by binding to SPS. This enzyme has several putative phosphorylation sites that regulate its activity by 14-3-3 dependent and independent mechanisms. Non-14-3-3 events include phosphorylation of SPS on Ser-424 and Ser-158 which is thought to be responsible for light/dark modulation and osmotic stress activation of the enzyme (McMichael et al, 1993; Toroser and Huber, 1997). However, there is a site-specific regulatory interaction between the 14-3-3 proteins and Ser-229 of spinach SPS, which inhibits SPS activity (Toroser et al, 1998). This regulatory node is likely to be the same one occurring in the NR regulation. In its unphosphorylated state, SPS is active. Phosphorylation by a kinase (e.g. SNF1, Bachmann et al, 1996; Moorhead et al, 1999) does

not inactivate SPS, but tags the enzyme for 14-3-3 binding, which completes the signal-induced transition towards inactivation. Phosphorylated SPS, bound by 14-3-3s, may be inactivated directly in a reversible manner or may be destabilized and subjected to proteolysis (Sehnke et al, 2002; Comparot et al, 2003). It has been reported that during sugar starvation, targets for 14-3-3 proteins are degraded by proteases. The function of this is not clear, but it has been suggested that it represents a safety valve for metabolic regulation (Cotelle et al, 2000). Various research groups have reported the impact of 14-3-3 proteins on metabolism. The over-expression of 14-3-3 proteins in potato induced an increase in catecholamine and soluble sugar contents in the leaves, whilst a 14-3-3 anti-sense experiment increased the tuber starch content, NR activity and amino acid composition (Prescha et al, 2001; Swiedrych et al, 2002). In addition, Zuk et al, (2003) observed a significant increase in potato SPS and NR activities when all of the six 14-3-3 isoforms were repressed.

One of the ESTs that was up regulated in LS plants codes for an SNF1-related protein (*SCEQLB2019B08.g*) (Table 1). SnRK1 (SNF1-Related Protein Kinase-1) is a plant protein kinase with a catalytic domain similar to that of SNF1 (Sucrose Non-fermenting-1) of yeast and AMPK (AMPactivated protein kinase) of animals (Halford et al, 2003). Carraro et al, (2001) identified at least 22 sugarcane expressed sequence tag (EST) contigs encoding putative SnRKs in the SUCEST database. Studies led to the hypothesis that SnRK1 is activated in response to high intracellular sucrose and/or low intracellular glucose levels (Halford et al, 2003). The first plant protein to be identified as a substrate for SnRK1 was a HMG-CoA reductase in *A. thaliana* (Dale et al, 1995). Subsequently, two other important enzymes, SPS and NR were shown to be substrates for *SnRK1* phosphorylation in Ser-binding sites. In both cases, phosphorylation results in inactivation of the enzyme, although the inactivation of NR and SPS also requires the binding of a 14-3-3 protein to the phosphorylation site (Bachmann et al, 1996; Moorhead et al, 1999). The sugarcane *SnRK1* transcript was up regulated in low sugar content mature leaves, nine months after planting (Figure 2). However it can be observed in Figure 3 that, at times, this transcript had the opposite expression profile. For example, its levels were lower in the low sugar content leaves, 6, 11 and 13 months after planting.

There is evidence that this class of protein kinases is involved in the regulation of

C4 photosynthesis. The C4 cycle is based on metabolic interactions between two leaf cell types, the mesophyll cells and the bundle-sheath cells. Annen and Stockhaus (1998) observed that the steady-state mRNA levels of the sorghum *SnRK1* were higher in the mesophyll fraction than in the bundle-sheath/vascular tissue fraction. In sugarcane this transcript was differentially expressed in source tissues, such as immature leaves, internodes, lateral buds and flowers. A weak expression could be seen in mature leaves and roots (Figure 4). This makes it unlikely that this kinase is involved solely in the regulation of developmental processes related to photosynthesis and leaf development.

The fact that three sugarcane *14-3-3* and a *SnRK1* were found to be more expressed in low sugar content individuals could reflect their involvement in an SPS inactivated state and account for the deficit in sugar synthesis by these plants.

#### *Lignin biosynthesis and secondary wall synthesis in low sugar content sugarcane plants*

Three enzymes are involved in the biosynthetic pathway of lignin: cinnamoyl-coenzyme A reductase (CCR), cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) and caffeic acid 3-*O*-methyltransferase (COMT). An EST coding for a COMT (*SCRFLR1012F12.g*) was found to be enriched in the low sugar content population (Table 1). Lignins are phenolic polymers found in the secondary cell walls of vascular plants. They play an important role by reducing the permeability of the cell wall to water, and provide mechanical strength and defense against wounding and infection (Lewis et al, 1990). Casu et al, (2004), observed the importance of lignin biosynthesis as a dominant process in maturing sugarcane stems. The storage parenchyma of the maturing sugarcane stem internodes is extensively lignified and Jacobsen et al, (1992) proposed that this process parallels with the increase in sucrose content observed in mature internodes. In this study it was observed that the LS plants had more lignified leaves and stem barks than the high sugar content ones (unpublished data of the present authors). The hypothesis was raised that transcripts of *COMT* were up regulated in these LS plants because their tissues were more lignified. This lignification could provide defense against wounding and infection of these plants.

Signals can be perceived and amplified at the cell membrane by receptors coupled to a variety of signaling pathways, including the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) pathway.

This second messenger is produced from the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate and raises the  $\text{Ca}^{2+}$  levels in the cytosol (Berridge et al, 1993). Inositol-polyphosphate 5-phosphatases (5Ptases) comprise a large group of enzymes that can hydrolyze 5-phosphates from a variety of inositol phosphates such as IP3 (Majerus et al, 1999). An EST coding for a 5PTase (*SCSBST3096H04.g*) was up regulated in the low sugar content population. This sugarcane *5PTase* was differentially expressed in mature LS leaves collected nine months after planting (Table 1). RNA-blot analysis confirmed the differential expression in three individual samples (Figure 2). However, as shown in Figure 3, the same expression profile was not observed throughout the growing season. *5PTase* was over expressed in LS plants only at nine and thirteen months after planting. For the other time-points a slight difference in the expression profile between high and low sugar content plants could be observed. It was also more expressed in mature leaves in comparison to the other tissues and a weak expression could be seen in sink tissues (Figure 4). 5PTases may be involved in the modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  levels and there is a lot of evidence for a role of  $\text{Ca}^{2+}$  in sugar signaling (Furuichi et al, 2001; Rolland et al, 2002). However, Zhong et al, (2004) demonstrated that the FRAGILE FIBER3 (*FRA3*) gene of *Arabidopsis thaliana*, which encodes a type II 5PTase, plays an essential role in the secondary wall synthesis in fiber cells and xylem vessels. The authors showed that *fra3* mutations caused a dramatic reduction in secondary wall thickness and a concomitant decrease in stem strength. In agreement of this expression profile in LS plants, we propose that sugarcane *5PTase* is involved in secondary wall synthesis in these plants, although the putative role of 5PTase in a  $\text{Ca}^{2+}$  signaling cascade triggered by sugars cannot be discarded. Further analysis is necessary to elucidate these mechanisms.

#### *Expression of stress-related proteins in low sugar content plants*

Sugar-signaling pathways do not operate in isolation but are part of cellular regulatory networks. Recent results clearly show cross talk between different signaling systems, especially those of sugars, phytohormones and light. It is interesting to note that seven stress-related genes were up regulated in the LS plants. Most of them are cold and drought induced and they also include a ribonuclease and a wound-induced protein. Three sugarcane stress-related ESTs belong to a class of low-molecular-weight hydrophobic

proteins involved in maintaining the integrity of the plasma membrane during cold, dehydration and salt stress conditions (*SCUTST3084F06.g*, *SCACCL6008H06.g*, *SCEPRZ3087C08.g*). These genes are activated by environmental factors, such as dehydration and salinity, and by chemical signals such as abscisic acid (ABA) (Morsy et al, 2005). Another differentially expressed stress-related gene encodes a plasma membrane intrinsic protein (*SCCCRZ1002E08.g*). These proteins facilitate water flux across cell membranes and play important roles in plant growth and development. One EST coding for a dehydrin (*SCQGLR1085F11.g*) was also up regulated in the LS plants. These proteins are supposed to stabilize macromolecules and/or protect membranes against chilling damage (Pearce et al, 1999). Two putative sugarcane dehydrin-like proteins were identified by Nogueira et al, (2003) in a sugarcane cold-response datamining. They proposed that these putative sugarcane antifreeze proteins could confer cellular membrane protection, reducing chilling injury. The S-like RNase (*SCJLRT1016G06.g*) is a protein present in higher plants that controls self-incompatibility. In a self-incompatible *Antirrhinum*, S-RNase transcription was induced during leaf senescence and phosphate (Pi) starvation but not by wounding, indicating that this gene plays a role in remobilizing Pi and other nutrients (Liang et al, 2002). Finally, a stress-related EST differentially expressed in low sugar content plants, is a protein described as being wound-induced (*SCCCLR2C01F06.g*).

All of these stress-related ESTs were differentially expressed in at least the nine-month samples of low sugar content sugarcane mature leaves (Table 1). This is of interest because, in general, a low sugar status enhances the expression of genes involved in photosynthesis, reserve mobilization and export, whereas the abundant presence of sugars promotes the expression of genes involved in growth and carbohydrate storage (Koch, 1996, Rolland et al, 2002). Nevertheless our results are in agreement with those observed in rice cell cultures, where the low sugar status also up regulated several stress-related genes (Ho et al, 2001). These authors suggested that sucrose starvation was a type of nutritional stress and that the expression of these stress-related genes might play roles in protecting cells against it.

#### *The transcription and ubiquitination category*

Two transcription factors and a protein involved in ubiquitination were up regulated

in low sugar content plants (Table 1). They code for a protein from the E2F/DP family (*SCCCLB1002B01.g*), a Tubby-like protein (*SCCCCL4001D08.g*) and a TIR1-like F-box containing protein (*SCCCCL6003D08.g*), respectively. In animals, the E2F family plays an important role in cell cycle control by regulating the transcription of genes involved in the progression from the G1 (G0) to the S phase. In *Arabidopsis*, De Veylder et al, (2002) showed that E2Fa-DPa was an important factor that determined the proliferative status of plant cells. Recently, Lai et al, (2004) identified a TUBBY-like gene family with 11 members in *Arabidopsis*, and all of them contained a conserved F-box domain. Recent studies on the auxin response have focused on the functions of three sets of proteins: the auxin (Aux) response factors (ARFs), the Aux/IAAs, and the F-box protein TIR1. TIR1 is part of a ubiquitin protein ligase required for degradation of Aux/IAA proteins (Yang et al, 2004). Many genes involved in carbohydrate metabolism, like a variety of protein kinases, protein phosphatases, 14-3-3 proteins and  $Ca^{2+}$  as a second messenger, are sugar regulated at the transcriptional level. However, little is known on how the transcription factors identified in this work could be involved in such regulation.

In conclusion, 24 sugar-associated genes were identified in a sugarcane population segregated for sugar content. These results suggest that sugar levels seem to modulate gene expression at the transcriptional level through a complex signal transduction network that may involve common responses related to stress. The data provide an insight into the role of sugar levels in signal transduction pathways. Some expression trends of sugar starvation such as up regulation of 14-3-3 proteins, an SnRK1 and stress-related proteins were substantiated by the present data at the transcript level. An in-depth analysis of these components should improve our knowledge on how signal transduction can regulate sucrose synthesis in sugarcane plants.

## MATERIAL AND METHODS

### *SUCAST Catalogue Annotation*

The Sugarcane cDNA sequences can be found in the SUCEST database (<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/public>) and GenBank under Accession Numbers CA064599-CA301538. Members of the SUCAST catalogue were identified using the BLAST algorithm (Altschul et al, 1997) with conserved protein sequences as drivers, as described previously (Papini-Terzi et al, 2005).

### *cDNA Microarrays*

Microarrays were constructed by arraying 1920 PCR-amplified cDNA fragments on derivative glass slides as described by Papini-Terzi et al, (2005). Fragments for which the amplification reactions were not satisfactory or hybridization signals were low were removed from the analysis. High quality data was obtained for a total of 1280 SAS, all of which had their identity confirmed by re-sequencing. Typically, four replicates of each cDNA fragment were spotted on each slide.

### *Sugarcane Tissue Samples*

Five hundred sugarcane *F1* plants from a cross between two commercial varieties (SP80-180 X SP80-4966) were field-grown at the Cane Technology Center (CTC), Piracicaba, São Paulo, Brazil. They segregated for stem sugar content in a normal manner and the seven plants presenting extreme values for high sugar (HS) and low sugar (LS) were selected. Mature leaves (Leaf +1, according to Van Dillewijn 1952) were collected from the selected plants 6, 7, 9, 11 and 13 months after planting. For the microarray analyses, RNA extracted from leaves collected at the 9 months time point from the seven individuals of each group, were pooled. For the RNA blot analyses all five-time points were evaluated. The gene expression profiles were also validated independently, using three individuals from each group, at the same time point used for the microarray analyses.

The expression profile was also evaluated for six different tissues collected from 12

month old plants: mature leaf, immature leaf, immature internode, root, lateral bud and a mixture of flowers in different developmental stages, using the same commercial sugarcane varieties used in the SUCEST project (SP87-432 for flowers and SP80-3280 for other tissues). All tissue samples were stored at -80°C.

#### *Measurement of stem Brix*

The soluble solids (Brix) content were measured on a portable refractometer of the most mature internodes of each sugarcane segregant plant throughout the growing season.

#### *RNA extraction*

Frozen tissues were ground using a homogenizer. 2 - 2.5 g were weighed and ground to a fine powder in liquid nitrogen, using a pre-cooled mortar and pestle. The pulverized tissue was transferred to a 50 ml tube and homogenized with 5 ml Trizol® (Invitrogen) per gram of tissue. The manufacturer's recommendations for high polysaccharide content tissues were followed for the mature internode samples. The samples were incubated for 5 min at room temperature (RT), with occasional vortexing. The homogenate was centrifuged at 3,000 rpm; 4°C for 10 min and the supernatant transferred to a clean 50 ml tube. 0.2 ml of chloroform (RT) was added for each ml of Trizol® solution. The solution was mixed vigorously for 15 s and incubated for 3 min at RT. After centrifugation (3,000 rpm, 4°C, 15 min), the aqueous phase was transferred to tubes containing 0.6 volumes of isopropanol. The solution was mixed several times by gentle inversion and incubated at RT for 10 min. The tubes were centrifuged at 10,000 rpm, 4°C for 10 min and the supernatant carefully discarded. The pellets were washed with cold 75% ethanol and the samples briefly vortexed and centrifuged at 6,000 rpm for 5 min. The supernatant was again discarded and the pellets washed with cold 100% ethanol. After centrifugation, the supernatant was discarded and the pellets allowed to dry at RT for at least 10 min. The pellets were then re-suspended in 20 µl of warm diethyl pyrocarbonate-treated water, vortexing gently for about 15 min. The RNA samples were quantified in a spectrophotometer and loaded onto 1.0% agarose/formaldehyde gels for a quality inspection.

### *Probe Preparation and Hybridization*

Ten micrograms of total RNA were reverse transcribed and labeled using the CyScribe Post-Labeling kit (Amersham Biosciences), according to the manufacturer's instructions. The products of the labeling reactions were purified in filtering plates (Millipore Multiscreen MAFBN0B50) to remove unincorporated labeled nucleotides. The microarrays were co-hybridized with the fluorescently labeled probes. Hybridizations were performed overnight at 42°C in moist chambers. The slides were then washed in 1x SSC and 0.2% SDS (10 min, 55°C), twice in 0.1x SSC and 0.2% SDS (10 min, 55°C) and finally in 0.1 x SSC (1 min, RT). The slides were rinsed briefly in filtered milli-Q water and dried in a nitrogen stream. Each experimental step was carefully monitored to ensure high quality of the slides and the extracted data.

### *Data extraction and processing*

The slides were scanned using a Generation III Scanner™ (Molecular Dynamics, USA), processed using the ArrayVision (Imaging Research Inc.) software, filtered and normalized as previously described by Papini-Terzi et al, (2005). Identification of the differentially expressed genes was performed using a local implementation of the HTself method (Vencio and Koide 2005) that uses “self-self” hybridizations to derive an intensity-dependent cutoff for significant fold-changes. SAS presenting more than 70% of their replicates outside the fold-change cutoff curves, were defined as differentially expressed. Descriptions followed the MIAME guidelines and the data was deposited on GEO database under the accession numbers GSE1702 (series), GPL1375, GPL1376 (platforms), GSM29453 to GSM29506 (samples).

### *Validation of microarray results by RNA blot*

Electrophoresis of total RNA samples (10µg) was carried out on 1.5% formaldehyde-containing agarose gels by standard procedures (Sambrook et al, 1989) and transferred to a nylon filter (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences). For each gene tested, the longest EST clone of each SUCEST SAS was selected as a probe for RNA blot

hybridization. Inserts were labeled with the Read-To-Go kit (Amershan Biosciences) according to the protocol recommended by the manufacturer. Hybridized filters were exposed to imaging plates for 24 h and the digitized images of RNA blot hybridization signals detected using the FLA3000-G screen system (Fuji Photo Film, Japan) and quantified using the Image Gauge software v. 3.12 (Fuji Photo Film, Japan).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was funded by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). We are indebted to Adriana Y. Matsukuma and Denise Yamamoto for their technical assistance in microarray printing and scanning performed in the laboratory of the Cooperation for Analysis of Gene Expression (CAGE) and Dr. Sonia di Mauro for coordinating the distribution of the SUCEST clones. FSPT, FRR, JMF and RV were supported by FAPESP fellowships. MM was the recipient of a research fellowship from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## REFERENCES

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuc Ac Res* 25: 3389-3402.
- Annen, F. and Stockhaus, J. (1998). Characterization of a Sorghum bicolor gene family encoding putative protein kinases with a high similarity to the yeast SNF1 protein kinase. *Pl Mol Biol* 36: 529-539.
- Annen, F. and Stockhaus, J. (1999). SbRLK1, a receptor-like protein kinase of Sorghum bicolor (L.) Moench that is expressed in mesophyll cells. *Planta* 208: 420-425.
- Bachmann, M., Huber, J.L., Athwal, G.S., Wu, K., Ferl, R.J., and Huber, S.C. (1996). 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS Letters* 398: 26-30.
- Becraft, P.W. (2002). Receptor kinase signaling in plant development. *Ann Rev Cell Develop Biol* 18, 163-192.
- Berridge, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* 361, 315-325.
- Carraro, D.M., Lambais, M.R., and Carrer, H. (2001). In silico characterization and expression analyses of sugarcane putative sucrose non-fermenting-1 (SNF1) related kinases. *Gen Mol Biol* 24, 35-41.
- Carson, D.L. and Botha, F.C. (2002). Genes expressed in sugarcane maturing internodal tissue. *Pl Cell Rep* 20, 1075-1081.
- Carson, D.L., Hockett, B.I., and Botha, F.C. (2002). Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue. *Pl Science* 162, 289-300.
- Casu, R.E., Grof, C.P.L., Rae, A.L., McIntyre, C.L., Dimmock, C.M., and Manners, J.M. (2003). Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. *Pl Mol Biol* 52, 371-386.
- Casu, R.E., Manners, J.M., Bonnett, G.D., Jackson, P.A., McIntyre, C.L., Dunne, R., Chapman, S.C., Rae, A.L., and Grof, C.P.L. (2005). Genomics approaches for the identification of genes determining important traits in sugarcane. *Field Crops Res* 92, 137-147.
- Casu, R., Dimmock, C., Chapman, S., Grof, C., McIntyre, C.L., Bonnett, G., and Manners, J. (2004). Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. *Pl Mol Biol* 54, 503-517.

- Comparot, S., Lingiah, G., and Martin, T. (2003). Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* 54, 595-604.
- Cotelle, V., Meek, S.E.M., Provan, F., Milne, F.C., Morrice, N., and MacKintosh, C. (2000). 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved Arabidopsis cells. *EMBO J.* 19, 2869-2876.
- Dale, S., Arro, M., Becerra, B., Morrice, N.G., Boronat, A., Hardie, D.G., and Ferrer, A. (1995). Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from Arabidopsis thaliana, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by Brassica oleracea 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem* 233, 506-513.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T.S., Almeida Engler, J., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van Der Schueren, E., Jacqmard, A., Engler, G., and Inze, D. (2002). Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J.* 21, 1360-1368.
- Dodd, A.N., Salathia, N., Hall, A., Kevei, E., Toth, R., Nagy, F., Hibberd, J.M., Millar, A.J., and Webb, A.A.R. (2005). Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 309, 630-633.
- Ferl, R.J. (2004). 14-3-3 proteins: regulation of signal-induced events. *Physiol Plant* 120, 173-178.
- Furuichi, T., Mori, I.C., Takahashi, K. and Muto, S. (2001). Sugar-induced increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> in Arabidopsis thaliana whole plants. *Plant Cell Physiol.* 42, 1149-1155.
- Halford, N.G. and Paul, M.J. (2003). Carbon metabolite sensing and signalling. *Pl Biotech J* 1, 381-398.
- Halford, N.G., Hey, S., Jhurreea, D., Laurie, S., McKibbin, R.S., Paul, M., and Zhang, Y. (2003). Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Bot.* 54, 467-475.
- Hardie, D.G. (1999). Plant protein serine threonine kinases: Classification and functions. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50, 97-131.
- Ho, S.L., Chao, Y.C., Tong, W.F., and Yu, S.M. (2001). Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. *Plant Physiol.* 125, 877-890.
- Huber, S.C. and Huber, J.L. (1996). Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 431-444.
- Jacobsen, K.R., Fisher, D.G., Maretzki, A. and Moore, P.H. (1992). Developmental-changes in the anatomy of the sugarcane stem in relation to phloem unloading and sucrose

storage. *Bot Acta* 105, 70-80.

Jansen, R.C. and Nap, J.P. (2001). Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends in Genetics* 17, 388-391.

Jones, T.L. and Ort, D.R. (1997). Circadian regulation of sucrose phosphate synthase activity in tomato by protein phosphatase activity. *Plant Physiol.* 113, 1167-1175.

Koch, K.E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 509-540.

Koch, K.E. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Op Plant Biol* 7, 235-246.

Lai, C.P., Lee, C.L., Chen, P.H., Wu, S.H., Yang, C.C., and Shaw, J.F. (2004). Molecular analyses of the Arabidopsis TUBBY-like protein gene family. *Plant Physiol.* 134, 1586-1597.

Lewis, N.G. and Yamamoto, E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41, 455-496.

Liang, L.Z., Lai, Z., Ma, W.S., Zhang, Y.S., and Xue, Y.B. (2002). AhSL28, a senescence- and phosphate starvation-induced S-like RNase gene in *Antirrhinum*. *BBA - Gene Structure and Expression* 1579, 64-71.

Lunn, J.E. and Furbank, R.T. (1999). Sucrose biosynthesis in C-4 plants. *New Phytologist* 143, 221-237.

Majerus, P.W., Kisseleva, M.V., and Norris, F.A. (1999). The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J. Biol. Chem.* 274, 10669-10672.

McClung, C.R. (2001). Circadian rhythms in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52, 139-162.

McMichael, R.W., Klein, R.R., Salvucci, M.E., and Huber, S.C. (1993). Identification of the major regulatory phosphorylation site in sucrose-phosphate synthase. *Arch Bioch Biophysics* 307, 248-252.

Meyers, B.C., Galbraith, D.W., Nelson, T., and Agrawal, V. (2004). Methods for transcriptional profiling in plants. Be fruitful and replicate. *Plant Physiol.* 135, 637-652.

Moore, P.H. (2005). Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: towards developing an understanding of the gene-to-crop continuum. *Field Crops Res* 92, 119-135.

Moorhead, G., Douglas, P., Cotelle, ., Harthill, J., Morrice, N., Meek, S., Deiting, U., Stitt, M., Scarabel, M., Aitken, A., and MacKintosh, C. (1999). Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *The Plant Journal*

18, 1-12.

Morsy, M.R., Almutairi, A.M., Gibbons, J., Yun, S.J., and los Reyes, B.G. (2005). The OsLti6 genes encoding low-molecular-weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature. *Gene* 344, 171-180.

Nishiuchi, T. and Iba, K. (1998). Roles of plastid omega-3 fatty acid desaturases in defense response of higher plants. *J Plant Res* 111, 481-486.

Nogueira, F.T.S., De Rosa, V.E., Menossi, M., Ulian, E.C., and Arruda, P. (2003). RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiol* 132, 1811-1824.

Papini-Terzi, F.S., Rocha, F.R., Vencio, .Z.N., Oliveira, K.C., Felix, J.M., Vicentini, R., Rocha, C.D., Simoes, A.C.Q., Ulian, E.C., Di Mauro, S.M.Z., Da Silva, A.M., Pereira, C.A.D., Menossi, M., and Souza, G.M. (2005). Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. *DNA Res* 12, 27-38.

Pathre, U.V., Sinha, A.K., Shirke, P.A., and Ranade, S.A. (2004). Diurnal and seasonal modulation of sucrose phosphate synthase activity in leaves of *Prosopis juliflora*. *Biol Plant* 48, 227-235.

Pearce, R.S. (1999). Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Reg* 29, 47-76.

Pessoa Junior, A., Roberto, I.C., Menossi, M., Santos, R.R., Ortega Filho, S. and Penna, T.C.V. (2005). Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. *App Bioch Biotech* 121: 59-70.

Prescha, A., Swiedrych, A., Biernat, J., and Szopa, J. (2001). Increase in lipid content in potato tubers modified by 14-3-3 gene overexpression. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3638-3643.

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

Rolland, F., Moore, B., and Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14, S185-S205.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.

Sehnke, P.C., DeLille, J.M., and Ferl, R.J. (2002). Consummating signal transduction: The role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity. *Plant Cell* 14, S339-S354.

- Smeekens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51, 49-81.
- Souza, G.M., Simoes, A.C.Q., Oliveira, K.C., Garay, H.M., Fiorini, L.C., Gomes, F.D., Nishiyama-Junior, M.Y., and da Silva, A.M. (2001). The sugarcane signal transduction (SUCAST) catalogue: prospecting signal transduction in sugarcane. *Gen Mol Biol* 24, 25-34.
- Swiedrych, A., Prescha, A., Matysiak-Kata, I., Biernat, J., and Szopa, J. (2002). Repression of the 14-3-3 Gene Affects the Amino Acid and Mineral Composition of Potato Tubers. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2137-2141.
- Thum, K., Shin, M., Palenchar, P., Kouranov, A., and Coruzzi, G. (2004). Genome-wide investigation of light and carbon signaling interactions in Arabidopsis. *Genome Biology* 5, R10.
- Toroser, D. and Huber, S.C. (1997). Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate synthase in spinach leaves. *Plant Physiol.* 114, 947-955.
- Toroser, D., Athwal, G.S., and Huber, S.C. (1998). Site-specific regulatory interaction between spinach leaf sucrose-phosphate synthase and 14-3-3 proteins. *FEBS Letters* 435, 110-114.
- Van Dillewijn, C. (1952). Botany of sugarcane., Waltham Mass, ed. (EUA).
- Vencio, R.Z.N. and Koide, T. (2005). HTself: Self-Self based statistical test for low replication microarray studies. *DNA Res* 12, 211-214.
- Vettore, A.L., da Silva, F.R., Kemper, E.L., Souza, G.M., da Silva, A.M., et al, (2003). Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Res.* 13, 2725-2735.
- Yang, X., Lee, S., So, J.h., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Ge, L., Jensen, C., Hangarter, R., Hobbie, L., and Estelle, M. (2004). The IAA1 protein is encoded by AXR5 and is a substrate of SCFTIR1. *The Plant Journal* 40, 772-782.
- Yu, S.M. (1999). Cellular and Genetic Responses of Plants to Sugar Starvation. *Plant Physiol.* 121, 687-693.
- Zhong, R., Burk, D.H., Morrison, W.H., and Ye, Z.H. (2004). FRAGILE FIBER3, an Arabidopsis gene encoding a type II inositol polyphosphate 5-phosphatase, is required for secondary wall synthesis and actin organization in fiber cells. *Plant Cell* 16, 3242-3259.
- Zuk, M., Skala, J., Biernat, J., and Szopa, J. (2003). Repression of six 14-3-3 protein isoforms resulting in the activation of nitrate and carbon fixation key enzymes from transgenic potato plants. *Pl Science* 165, 731-741.

**TABLE 1**

<i>Category</i>	<i>SAS<sup>a</sup></i>	<i>Description of homologue<sup>b</sup></i>	<i>Accession number of homologue<sup>c</sup></i>	<i>E value<sup>d</sup></i>	<i>High<sup>e</sup></i>	<i>Low<sup>f</sup></i>
<b><i>Enriched expression in the high sugar content population</i></b>						
Hormone biosynthesis	SCSBAM1085B06.g	Omega-3 fatty acid desaturase-FAD8	T01696	1e-104	1.88	*
No matches	SCACLR1126E09.g	No matches			1.89	*
No matches	SCBFSD1035H11.g	No matches			1.93	
Receptors	SCEQRZ3020C02.g	RLK undefined with LRR- unclassified	CAB51480	1e-113	1.64	*
Transcription	SCCCLR1C08G10.g	LHY/CAA1	XP_480189.1	9e-69	1.79	*
<b><i>Enriched expression in the low sugar content population</i></b>						
Adapters	SCCCRZ1001D02.g	14-3-3 proteins	AAP48904	7e-140		1.81
Adapters	SCEQRT1025D06.g	14-3-3 proteins	BAB11739	2e-80		2.26
Adapters	SCEQRT1031D02.g	14-3-3 proteins	AAP48904	1e-117		1.90
Inositol	SCRFLR1012F12.g	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	AAQ67347	0.0		1.61
Inositol	SCSBST3096H04.g	Inositol-1,4,5-trisphosphate phosphatase	XP_475767	8e-62		3.07 *
Protein kinases	SCEQLB2019B08.g	SNF1-related	CAA73067	2e-73		2.28 *
Putative protein	SCCCLR2002H11.g	Putative CGI-94 protein	BAD68235	8e-96		1.69
Stress	SCJFLR1074E09.g	Dehydrin	AAA33480	6e-48		1.81 *
Stress	SCEPRZ3087C08.g	Low temperature induced (LTI)	AAT37942	6e-24		2.40
Stress	SCUTST3084F06.g	Low temperature induced (LTI)	AAV88601	7e-18		2.65
Stress	SCBFLL5074C09.g	Reversibly glycosylated polypeptide	XP_479089	0.0		1.63
Stress	SCCCLR1024C03.g	Tonoplast intrinsic protein	AAC09245	6e-102		1.90
Stress	SCQGLR1085F11.g	Dehydrin	AAB05927	7e-20		2.57
Stress	SCJLRT1016G06.g	Ribonuclease	AAS01727	1e-106		2.38
Stress	SCCCLR2C01F06.g	Wound-induced	CAA42537	2e-17		2.03
Transcription	SCCCLB1002B01.g	DP transcription factor	AAO72671	5e-109		1.86
Transcription	SCCCLL4001D08.g	Tubby-like protein 7	AAM18187	1e-71		1.94
Ubiquitination	SCCCLL6003D08.g	F-box containing protein TIR1-like	XP_467902	1e-173		1.98
Unknown protein	SCSFLL8048D12.g	Unknown protein	XP_467976	9e-36		3.62

## LEGENDS

**TABLE 1.** *Sugarcane genes showing differential expression between high and low sugar content populations.* <sup>a</sup> Sugarcane Assembled Sequence; <sup>b</sup> The description indicates the putative function of the gene products expected from the similarity sequences by searches using the BlastX algorithm and the corresponding SUCAST category; <sup>c</sup> The accession number of the homologue in the NCBI public database; <sup>d</sup> E value; <sup>e, f</sup> Fold increase in expression observed for these ESTs in a high (<sup>e</sup>) or low (<sup>f</sup>) sugar content population. Asterisks represent ESTs that were validated by RNA-blot.

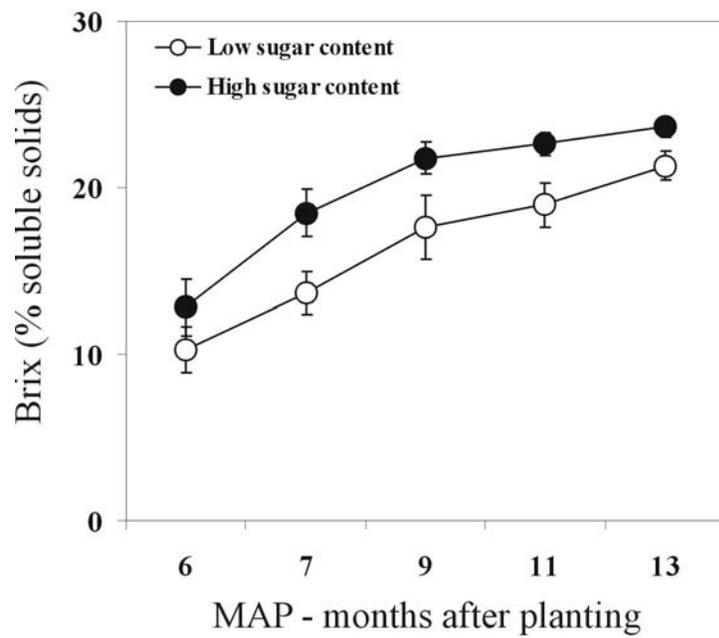
**FIGURE 1.** *Sugar content throughout the growing season in the extreme individuals of a sugarcane segregated population.* The Brix (soluble solids) values of the most mature internodes of each sugarcane segregant plant were measured throughout the growing season. Average Brix values and standard deviations for the seven individuals with the highest or lowest sugar contents are shown for the times indicated.

**FIGURE 2.** *Expression levels of differentially expressed genes in sugarcane individuals.* RNA blots were prepared using 10 µg of total RNA isolated from mature leaves of three individual clones of each segregated population (HS - high and LS - low sugar contents). The time point evaluated in the blots corresponds to the same one used in the cDNA microarray experiments (9 months after planting). Blots were hybridized with the gene-specific radioactive probes indicated. An rDNA fragment was used as the control.

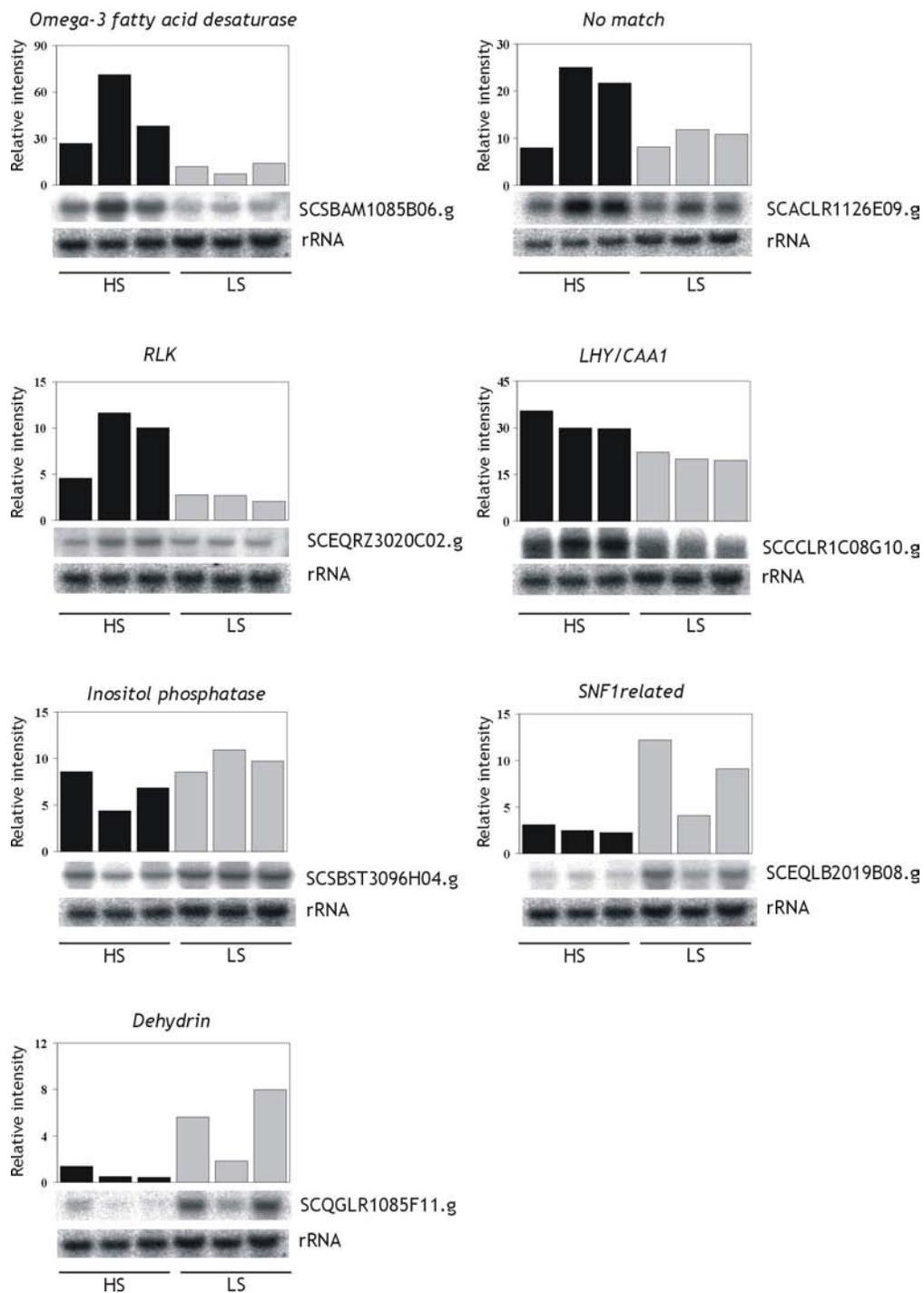
**FIGURE 3.** *Expression profiles of differentially expressed genes throughout the growing season.* RNA-blot were prepared from total leaf-RNA from a pool of 7 individuals with high (HS) and low (LS) sugar contents collected throughout the growing season (6, 7, 9, 11 and 13 months after planting). The inset graphs show the expression levels observed for the high (black circles) and low (white circles) sugar content plants. An rDNA fragment was used as the control.

**FIGURE 4.** *Gene expression analysis in different tissues.* For the RNA gel blot preparation, each lane was loaded with 10 µg of total RNA isolated from one of six tissues from sugarcane. ML – mature leaves; IL – immature leaves; II – immature internode; RT – root; LB – lateral bud; FL – flowers. The same blot was hybridized to the indicated cDNA probes. An rDNA fragment was used as the control.

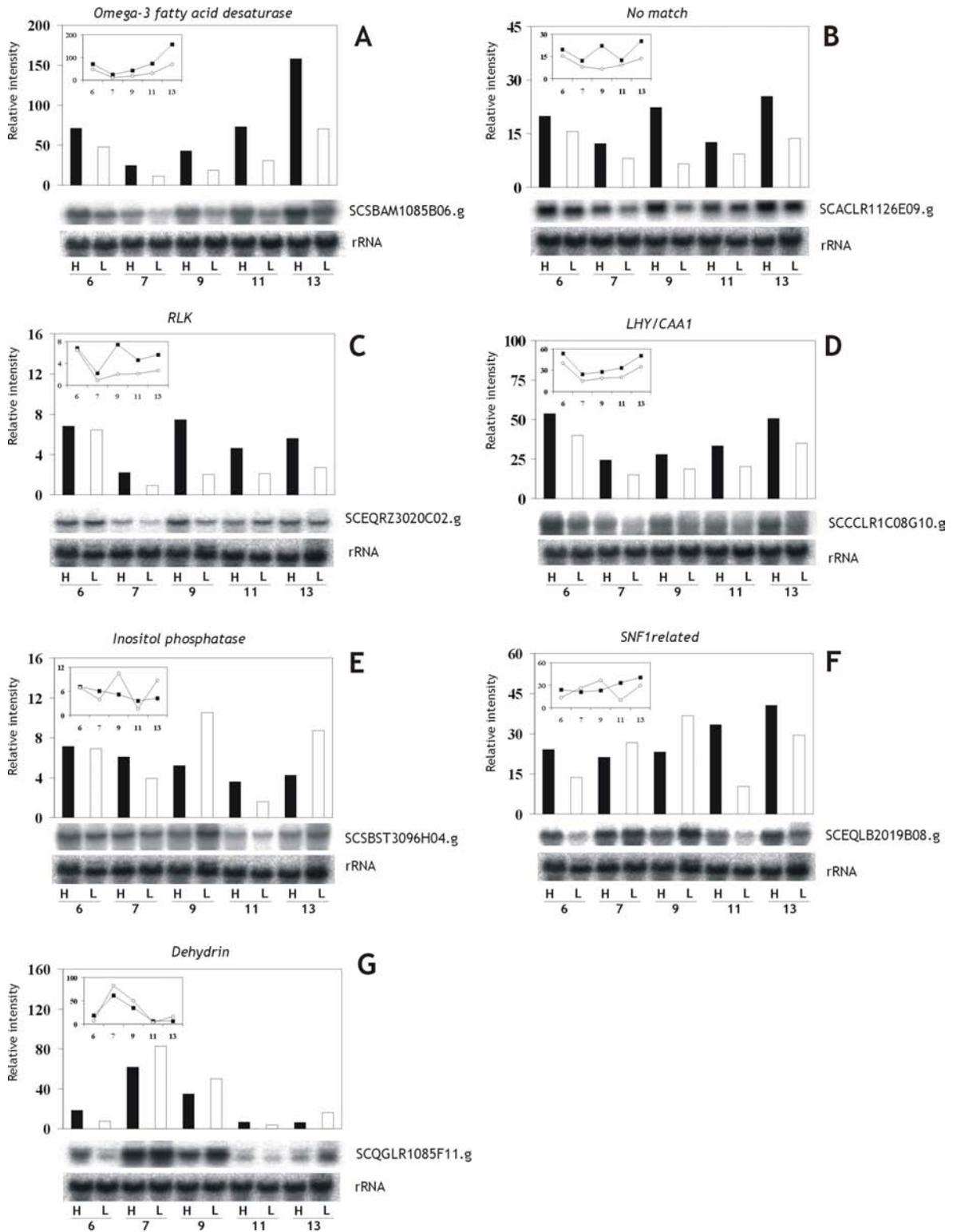
**FIGURE 1**



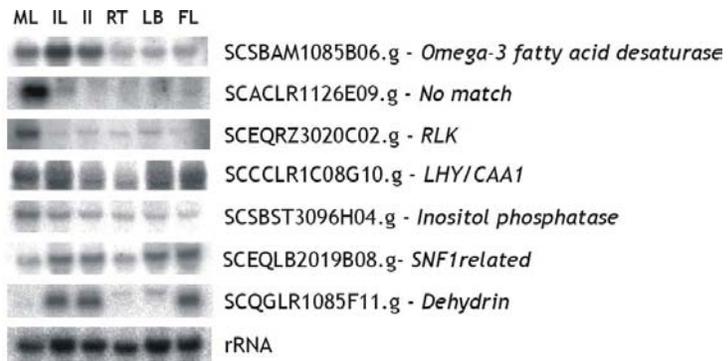
**FIGURE 2**



**FIGURE 3**



**FIGURE 4**



## ***Capítulo III***

---

### ***Análise da transdução de sinais relacionada à acumulação de açúcar***

**Juliana de Maria Felix**, Flávia Stal Papini-Terzi, Flávia Riso Rocha, Ricardo Zorzetto Nicolliello Vêncio, Renato Vicentini, Milton Nishiyama-Jr, Eugênio César Ulian, Marcelo Menossi, Gláucia Mendes Souza

## Resumo

São várias as evidências de que açúcares agem como moléculas sinalizadoras, modulando a expressão gênica, tanto nos níveis transcricionais como pós-transcricionais. Os sistemas de percepção e sinalização que estão envolvidos nesse processo formam uma complexa rede que envolve metabólitos, enzimas, transportadores, fatores de transcrição e hormônios. Porém sabe-se muito pouco a respeito de como as vias de transdução de sinal estariam relacionadas no amadurecimento dos entrenós de cana-de-açúcar. Identificar os componentes participantes dessa via é de extrema importância para futuras modificações genéticas que visam o aumento do teor de sacarose nas plantas. Foi analisado o perfil de expressão de 1,920 genes de cana-de-açúcar codificantes para elementos de transdução de sinal, fatores de transcrição e proteínas relacionadas a estresse, conciliando o banco de dados do SUCEST e a tecnologia de *microarrays*. Com o objetivo de avaliar o envolvimento desses componentes no acúmulo de sacarose, esse *chip* foi hibridizado com entrenós em desenvolvimento (1, 5 e 9) de indivíduos de cana-de-açúcar contrastantes para teor de sacarose, coletados 7 meses pós plantio. Para tal foram selecionados os sete indivíduos contrastantes para a característica a partir de uma população F1 de 500 indivíduos. Oitenta e oito genes foram identificados como diferencialmente expressos em pelo menos um entrenó analisado. A maior parte dos ESTs diferencialmente expressos estão catalogados como envolvidos com estresse (23,8%), seguido da categoria de proteínas quinases (12,5%), patogenicidade (9,0%) e biosíntese de hormônios (7,9%). O perfil de expressão de três genes foram validados por *Northern blot*. Nossos dados refletem que níveis de açúcar podem modular uma complexa rede de transdução de sinal que também parece englobar a resposta a estresse.

## Introdução

Os mecanismos de regulação do metabolismo de carbono são fundamentais para o desenvolvimento das plantas, sendo responsáveis pelo equilíbrio existente nas reações enzimáticas bem como pelo fluxo de carbono nas vias metabólicas. Entender como esse metabolismo é regulado é de extrema importância para futuras modificações genéticas que visam o aumento da produtividade das plantas. No início da década de 80, a regulação metabólica era conhecida apenas pelas propriedades e funções enzimáticas e seus diferentes níveis ao longo das vias. Hoje sabe-se que a atividade da maior parte destas enzimas responde ao suprimento de carbono e energia, na sua ativação/desativação por fosforilações e ao controle de sua expressão gênica. Sabe-se também que o controle do metabolismo envolve uma regulação coordenada de genes e enzimas nos níveis transcricionais, tradução e nas modificações pós-traducionais. Além disso, a via de sinalização do metabolismo de carbono interage com outras vias, incluindo a via de resposta a hormônios, estresses bióticos e abióticos, resposta ao ataque de patógenos, mecanismos de controle celular e sistemas de resposta a nitrogênio, dentre outros (revisado por Halford e Paul, 2003).

### *Expressão gênica associada ao amadurecimento*

O crescimento e desenvolvimento das plantas é caracterizado por uma vasta mudança bioquímica e fisiológica. A alongação dos entrenós da cana-de-açúcar, por exemplo, vem acompanhada do aumento de concentrações de sacarose nesses tecidos (Moore, 1995), ou seja, quanto mais desenvolvido for o entrenó, maiores concentrações de açúcar ele apresentará. Sendo assim, o acúmulo de sacarose em um entrenó maduro de cana-de-açúcar pode chegar a concentração de 650 mM (Welbaum e Meinzer, 1990), impondo um considerado estresse osmótico nas células desse tecido e desencadeando uma resposta de defesa na planta. De fato, genes relacionados a estresse sempre foram encontrados como diferencialmente expressos em entrenós maduros de cana (Carson et al, 2002; Casu et al, 2001, 2003, 2004). Há também diversas pesquisas que relatam a expressão de genes de resposta à estresse em associação ao desenvolvimento em outras espécies. Roitsch (1999) demonstrou que uma elevada concentração de sacarose pode induzir a expressão de genes relacionados a estresse, tais como as proteínas PR (*Pathogen-related*), e conseqüentemente induzir resistência a um possível ataque por patógenos.

Similarmente foi observado que elevados níveis de açúcar induziram o acúmulo de proteínas antifúngicas no amadurecimento de uvas (Zhu-Salzman et al, 1998).

A maturidade do entrenó em cana também é associada a abundância de transcritos participantes da biosíntese de fibras, de um modo geral. A região central do colmo apresenta uma considerável lignificação e suberização nas células parenquimáticas que rodeiam o feixe vascular, restringindo o movimento apoplástico de solutos entre o feixe vascular e as células parenquimáticas de estocagem de sacarose (Jacobsen et al, 1992). De fato, transcritos envolvidos com lignificação e suberização encontraram-se como diferencialmente expressos em entrenós maduros de cana-de-açúcar (Casu et al, 2004). De um modo geral, a maturação dos órgãos e tecidos vem acompanhada de uma diminuição na atividade gênica como um todo. A maturação em entrenós por exemplo, acarretou a redução de expressão de histonas associadas com a replicação de DNA, o que provavelmente reflete uma redução na divisão celular nesse tecido (Casu et al, 2004).

Esperava-se que transcritos envolvidos com metabolismo de carboidrato fossem diferencialmente expressos nesses tecidos em maturação, uma vez que o acúmulo de sacarose é constante ao longo dos entrenós. Porém diversos grupos de pesquisa (e também nossos dados, não mostrados) relataram o contrário: a ausência desses transcritos nesses tecidos (Carson et al, 2002; Casu et al, 2003, 2004). Resultados similares foram encontrados em uva, conhecida por estocar açúcares e metabólitos secundários, onde apenas uma pequena porção de seus transcritos estão relacionados ao metabolismo de carboidrato, como transportadores de açúcar, por exemplo (Ablett et al, 2000). Assim como em morangos, nenhum dos cDNAs induzidos durante a maturação do fruto era homólogo a genes diretamente relacionados a esse processo, como metabolismo da parede celular, acúmulo de açúcar e pigmento (Nam et al, 1999). Mas por outro lado, genes relacionados com outras vias metabólicas foram encontrados como diferencialmente expressos durante o amadurecimento do fruto; fato similar ao que ocorre durante a maturação dos entrenós da cana-de-açúcar.

#### *Transdução de sinal e sinalização por açúcar em plantas*

A regulação do metabolismo de carbono em plantas responde diretamente aos níveis de fotoassimilados disponíveis nas células. Os sistemas de percepção e sinalização que estão envolvidos nesse processo formam uma complexa rede que envolve metabólitos,

enzimas, transportadores, fatores de transcrição e hormônios. Dessa forma, os sensores de açúcar iniciam uma cascata de transdução de sinal que acarretará em uma alteração na expressão gênica. Estudos fisiológicos e moleculares têm demonstrado que a síntese e transporte de açúcar são processos altamente regulados, sendo que uma variedade de genes possui regulação transcricional frente à mudanças nos níveis intracelulares de açúcar. Para ativar as vias de transdução de sinal os açúcares têm que ser primeiramente detectados. Porém ainda é desconhecido os mecanismos utilizados pelas plantas para sentir o açúcar e processar essa informação. Para driblar esse desconhecimento, utiliza-se a levedura como modelo essencial de estudos nos mecanismos de sinalização por açúcar e transdução de sinal. Nesse organismo, os genes necessários para seu crescimento em meios contendo outras fontes de carbono, não sendo glicose, são reprimidos quando a glicose é adicionada e voltam a ser ativados quando a glicose é retirada do meio. Esse fenômeno de repressão por glicose requer um mecanismo de sinalização mediado por açúcar. A hexokinase, enzima que catalisa a fosforilação de hexoses como um primeiro passo na via glicolítica, tem sido sugerida como um sensor de glicose em leveduras (Rose et al, 1991). Outra tentativa de estudo das respostas de sinalização a açúcares é utilizar açúcar e seus análogos *in vitro* em plântulas, tecidos e protoplastos ou culturas celulares. Com essa ferramenta, dois mecanismos de sinalização por açúcar foram propostos em plantas, hexokinase (HXK) - dependente e independente. Na sinalização dependente de HXK, essa enzima parece ativar diretamente uma cascata de sinalização. Por outro lado, na sinalização independente de HXK, a expressão gênica é regulada diretamente por dissacarídeos, sacarose ou trealose (Smeekens, 2000; Rolland et al, 2002). São vários os experimentos que tentam elucidar como os metabólitos são reconhecidos pelas plantas. Um deles demonstra claramente que tanto glicose quanto sacarose causam uma resposta nas células, porém o que não se sabe é se esses metabólitos são reconhecidos por si só ou não (revisado por Halford e Paul, 2003).

Um dos mecanismos mais conhecidos na transdução de sinal é a fosforilação/desfosforilação de proteínas. O uso de inibidores específicos tem relatado o envolvimento de quinases e fosfatases na sinalização de açúcar em plantas, tais como as fosfatases PP1 e PP2A e a quinase SnRK (família de quinases em plantas, ortólogas às conhecidas Snf1 de leveduras)(revisado por Rolland et al, 2002). Em plantas, essa quinase (SnRK1) parece estar envolvida na via de sinalização de açúcar (Hardie 1999), onde

fosforila e inativa a HMG-CoA redutase, a sacarose fosfato sintase (SPS) e a nitrato redutase (NR); sendo considerada enzima regulatória na síntese de sacarose, inibindo sua via metabólica. A maior evidência de que a SnRK1 está envolvida no controle do metabolismo de carboidrato veio através da identificação de seus substratos e genes regulados por ela. Além de ser ativada em resposta aos altos/baixos níveis intracelulares de sacarose/glicose (Halford e Dickinson, 2001), foi demonstrado, por exemplo, de que a SPS é substrato para a SnRK1 através da fosforilação de um sítio serina. Uma vez fosforilada, a proteína adaptadora 14-3-3 se ligará à esse sítio serina para sua completa inativação (Bachmann et al, 1996; Moorhead et al, 1996). Parece também que a via da MAP kinase está envolvida na regulação de respostas à vários estímulos endógenos e exógenos em plantas, além do seu envolvimento nas vias de sinalização por açúcar (Ehness e Roitsch, 1997).

Há também várias evidências de uma integração entre as vias de sinalização e resposta à fitohormônios, fosfato, luz, açúcares e estímulos por estresse bióticos e abióticos. Essa complexa interação entre os níveis de transdução de sinais e regulação da expressão gênica parecem fazer parte da principal regulação fonte-dreno. São diversas as pesquisas que relacionam os níveis de açúcar com a regulação das vias de transdução de sinal em plantas. Os estímulos relacionados a estresses, por exemplo, podem ser tanto bióticos quanto abióticos. A água é um importante fator na alocação de carbono sendo que a seca, por sua vez, é um dos maiores fatores limitantes de produtividade. O estresse hídrico induz diversas alterações na relação fonte-dreno, uma vez que ocorrem modificações no crescimento e conseqüente redução na performance dos órgãos fotossintetizantes. A salinidade é outro importante fator ambiental que resulta em um crescimento sub-ótimo. O estresse salino não somente altera os níveis fotossintéticos como também os tipos de carboidrato a serem sintetizados e exportados para os tecidos dreno (Gilbert et al, 1997; Gucci et al, 1998).

Açúcares podem modular a expressão gênica, tanto nos níveis transcricionais como pós-transcricionais, através de uma complexa rede de transdução de sinal. Dessa maneira, esse presente trabalho visa a identificação dos componentes participantes dessa via associados à maturação, e conseqüente acúmulo de sacarose, em cana-de-açúcar. Para tal foram utilizadas amostras de entrenós em desenvolvimento (1, 5 e 9) de indivíduos

contrastantes para teor de açúcar, pertencentes à uma população segregante para essa característica. Essas amostras foram hibridadas no chip SUCAST, que contém 1,290 elementos participantes de vias de transdução de sinal. Análises permitiram identificar 88 genes diferencialmente expressos, possivelmente participantes das vias de transdução de sinal frente ao acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material vegetal*

O material vegetal utilizado para este trabalho está descrito no capítulo II. Neste trabalho foram utilizadas amostras bulkadas de entrenós 1, 5 e 9 de 7 indivíduos de alto e baixo teor de sacarose pertencentes à coleta 2 (7 meses pós plantio).

### *Extração de RNA*

O RNA total foi extraído com Trizol (Life Technologies, EUA), conforme as modificações para tecidos ricos em polissacarídeos, recomendado pelo fabricante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (GeneQuant, AP-Biotech, SP-Brasil), confirmado em gel de agarose com formaldeído e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### *Manutenção dos clones bacterianos*

As placas de 96 poços contendo os clones de bactérias fornecidos pelo BCCC (UNESP, Jaboticabal) foram armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Réplicas para manutenção do estoque foram feitas em 100 $\mu\text{l}$  de meio TB (1,2% bacto-triptona, 2,4% extrato de levedura, 0,4% glicerol, 0,017M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,072M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), com incubação em estufa  $37^{\circ}\text{C}$  por 14 horas. Após o crescimento, foi adicionado igual volume (100 $\mu\text{l}$ ) de glicerol 30%, resultando numa concentração final de glicerol de cerca de 15%. Para as ampliações por PCR foram utilizadas as placas originais, que têm meio de cultura com 8% de glicerol.

### *Amplificação de fragmentos por PCR*

Os fragmentos de DNA de interesse foram amplificados por PCR em placas de 96 poços (Fisher Scientific International Inc.). Uma mistura com todos os reagentes foi preparada e 100  $\mu\text{l}$  desta solução foram então dispensados em cada um dos 96 poços da placa de PCR. As colônias de bactérias em meio de cultura foram transferidas (2x) para a solução utilizando-se um repicador manual de 96 colônias.

Foram utilizados os oligonucleotídeos universais T7 e SP6 (Invitrogen Brasil). Para cada reação, a concentração final dos reagentes foi de 1x Tampão Taq Polimerase; 1,5mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,8mM de 4dNTPs; 30pmol de primer T7; 30pmol de primer SP6 e 1U/100 $\mu\text{L}$  de Taq Polimerase. A ciclagem foi de  $95^{\circ}\text{C}$  por 45s; 40 ciclos de  $51^{\circ}\text{C}$  por 30seg -  $72^{\circ}\text{C}$  por 2min; e uma extensão final a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 10min.

Uma alíquota de 4 $\mu\text{l}$  da solução contendo os produtos amplificados foi submetida a

eletroforese em gel de agarose 1%. As placas contendo o restante dos fragmentos amplificados foram armazenadas em freezer -20°C. O tampão usado para o preparo do gel e para a eletroforese foi o TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA pH 8,0). O gel foi corado com 0.5µg/ml de brometo de etídio (EtBr). O plasmídio pUC18 pré-digerido com Sca I, Nde I e Hind III foi usado como marcador de concentração e massa.

#### *Purificação dos produtos de PCR*

Os produtos de reação de PCR foram purificados de acordo com protocolo padronizado pela aluna de pós-doutorado Flávia Papini-Terzi, sob coordenação da profa. Dra. Gláucia M. Souza (IQ – USP). Alíquotas de 2µl das amostras purificadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% para quantificação.

#### *Deposição dos fragmentos amplificados em lâminas de vidro*

As amostras amplificadas em placas de 96 poços foram rearranjadas em placas de 384, misturadas com igual volume de reagente D (AP-Biotech, EUA) e depositadas pelo equipamento *Generation III Microarrays Spotter™* (AP-Biotech, EUA) em lâminas espelhadas tipo 7 silanizadas. Fotos deste e dos demais equipamentos utilizados podem ser encontradas em uma visita virtual ao laboratório de *microarrays* do CAGE (Cooperação para Análise de Genes e sua Expressão) pelo site <http://bioinfo.iq.usp.br/cagelab>. Após a deposição dos fragmentos de DNA, as lâminas foram submetidas a 50mJ de luz UV para ligar covalentemente as fitas de DNA às lâminas, e então armazenadas em dessecador.

#### *Transcrição reversa e marcação do cDNA*

As amostras de RNA total foram quantificadas em espectrofotômetro e analisadas em gel de agarose para verificação da concentração e integridade do material. As reações de marcação fluorescente foram preparadas utilizando-se o “CyScribe Post-Labeling kit” (AP-Biotech, EUA), seguindo as instruções descritas pelo fabricante. Foram utilizados 7 a 10µg de RNA total de cada amostra por reação. Além do RNA de interesse, 0,5µl de RNA “spike” fornecido juntamente com o Scorecard Universal Lucidea™ foi adicionado à reação, para que as amostras de DNA sintético (controle do *chip*) pudessem ser reconhecidas. Quatro microlitros de oligo-dT foram utilizados na reação. Depois de marcadas, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 550nm para Cy3, 650nm para Cy5, 260nm para checar a síntese de cDNA.

### *Hibridização e lavagem dos microarrays*

As amostras marcadas foram secas completamente em speed-vac e em seguida ressuspendidas em 6,75µl de água milli-Q tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC). As duas sondas (Cy3 e Cy5) foram misturadas e acrescidas de 13,5µl de Tampão de Hibridização (Microarray Hybridization Buffer- AP-Biotech, EUA) e 27µl de formamida. Em seguida, esta solução foi incubada a 92°C por 2min e imediatamente resfriada em gelo. Os 54µl de solução foram então depositados em uma das extremidades da lâmina. Uma lamínula foi cuidadosamente colocada sobre a lâmina contendo a solução. O arranjo foi colocado em um suporte e incubado na posição horizontal em banho 42°C por 16h. Após a hibridização, a lâmina foi lavada sob leve agitação em soluções SSC/SDS: 1xSSC, 0,2% SDS por 10min a 55°C; 0,1xSSC, 0,2% SDS por 10min a 55°C; 0,1xSSC, 0,2% SDS por 10min a 55°C; 0,1xSSC por 10min a temperatura ambiente e 4 mergulhos em água milli-Q. Após as lavagens, a lâmina foi seca imediatamente com Nitrogênio, para evitar arrastes de solução. A leitura dos sinais (scanning) foi realizada em PMT 700 para os dois canais, utilizando-se o scanner confocal (Generation III Scanner™).

Todos os procedimentos descritos acima foram feitos sem incidência direta de luz.

### *Obtenção e armazenamento dos dados*

As imagens geradas após a leitura dos sinais foram analisadas com o programa *ArrayVision* (Imaging Research, Canada). A extração dos dados foi feita utilizando-se a densidade MTM (*Median-based Trimmed Mean*) como medida principal. A medida MTM representa o valor médio de todos os pixels que permaneceram na análise depois de removidos os pixels com valores de densidade muito acima ou muito abaixo da mediana (que excedam 4 MADs - *Median Absolute Deviations*). O programa também calcula o nível de ruído de fundo (background) e fornece os valores de intensidade já descontando-se o ruído. É também calculada a razão das intensidades (expressão) entre os dois canais, medida que é utilizada para as análises comparativas.

### *Processamento dos dados*

Scripts personalizados para o processamento dos dados foram desenvolvidos em ambiente R, tal como descrito por Vêncio et al, 2005. Uma seqüência de etapas foi estabelecida para padronizar a análise dos dados, como se segue:

- 1) Filtro: *spots* com morfologia alterada, sujeira ou relativos a clones com falha na PCR foram considerados de má qualidade e seus dados foram removidos das análises;
- 2) Normalização: os dados válidos foram normalizados utilizando o algoritmo Lowess (Yang *et al*, 2002);
- 3) Valores medianos: os valores razão provenientes das réplicas técnicas foram unificados calculando-se a mediana dos pontos e seus respectivos desvios;
- 4) Reprodutibilidade: para cada clone avaliado foi feita uma estimativa de reprodutibilidade, calculando-se a porcentagem de pontos-réplica que apontavam um gene como diferencialmente expresso ou não. Os clones em que pelo menos 70% da réplicas foram concordantes foram considerados confiáveis.

#### *Clusterização*

Concluídas as diferentes etapas do processamento, os genes selecionados foram agrupados segundo seus padrões de expressão. Para tal, utilizamos diferentes algoritmos de clusterização disponíveis no programa Spotfire DecisionSite 7.1 (Spotfire Inc., EUA). Esse programa permite a visualização dos dados em diferentes modos de exibição e possui ferramentas variadas que facilitam as análises. De uma forma geral, utilizamos as configurações-padrão com os ajustes mínimos necessários para a Clusterização Hierárquica ou por Self Organizing Maps (SOM).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cana-de-açúcar é a única gramínea cultivada que possui a habilidade de acumular sacarose em altas concentrações em seu colmo. É de se imaginar que diversos processos, não necessariamente envolvidos diretamente ao metabolismo de sacarose, sejam necessários para manter a integridade e homeostase celular, além de prover um suporte físico durante esse processo. Nesse presente estudo, microarranjos contendo 1,920 ESTs envolvidos com transdução de sinal foram hibridados com cDNA obtidos de RNA de indivíduos segregantes para teor de sacarose, coletados 7 meses pós-plantio, provenientes de entrenós em desenvolvimento: imaturos (1), intermediários (5) e maduros (9). Apesar da análise de expressão gênica direcionada à maturação do colmo de cana-de-açúcar já ter sido efetuada (Casu et al, 2004), esse é o primeiro relato que visa o estudo específico de como vias de transdução de sinal atuam nessa etapa de desenvolvimento da planta, além de correlacioná-las à diferenças no teor de sacarose entre plantas de uma população segregante.

### *Categorização dos ESTs diferencialmente expressos*

Após hibridação e captação da imagem das lâminas hibridadas com sondas de cDNA, os valores obtidos foram submetidos a uma série de normalizações (tal como descrito no Material e Métodos). Dentre os 1,920 SASs originalmente fixados nos microarrays, foi obtido um conjunto de 88 cuja expressão apresentava uma resposta diferencial entre os indivíduos segregantes analisados. Os clones selecionados tiveram sua identidade confirmada em bancos de dados públicos e suas possíveis funções categorizadas de acordo com a anotação do projeto SUCAST. Na Tabela 1 estão anotados os ESTs considerados como diferencialmente expressos em nossas amostras, sendo que em vermelho estão os genes diferencialmente expressos naquele tecido nos indivíduos contendo alto teor de sacarose (AS), e em verde estão os diferencialmente expressos nos indivíduos contendo baixo teor de sacarose (BS). Observa-se nessa tabela que foi possível classificar os genes diferencialmente expressos em 14 categorias, sendo elas: *Calcium*, *Development*, *Hormone biosynthesis*, *Inositol*, *No matches*, *Others*, *Pathogenicity*, *Protein kinases*, *Protein Phosphatases*, *Receptors*, *Stress*, *Transcription*, *Ubiquitination* e *Unknown*

*protein*. Dentre estas categorias, a mais representativa foi *Stress* (26% dos genes diferencialmente expressos em AS e 29% em BS) (Figura 1). É interessante observar que genes que possuem a mesma função também apresentaram o mesmo perfil de expressão (Tabela 1). Como exemplo temos 5 SASs codificantes para a proteína tonoplástica de membrana aquaporina que foram diferencialmente expressos em entrenós maduros (9) em indivíduos AS. Genes envolvidos com vias de sinalização por cálcio também apresentaram padrão de expressão semelhante, sendo todos diferencialmente expressos somente em indivíduos AS; os receptores serina/treonina quinase também foram diferencialmente expressos em indivíduos AS (exceto para o SAS SCBFFL4114B06.g, que apresentou expressão diferencial em amostras de entrenó 5 de indivíduos BS) e genes codificantes para receptores R, envolvidos com patogenicidade, foram diferencialmente expressos em amostras de entrenó 5 de indivíduos BS. Esse perfil de expressão semelhante entre genes codificantes para a mesma função demonstra a robustez de nossos resultados.

#### ***Clusterização hierárquica e intersecção entre tecidos***

Uma vez identificados os SASs diferencialmente expressos e suas possíveis funções, a análise de padrões de expressão semelhantes entre eles pode levar à identificação de grupos de genes envolvidos em vias de transdução de sinais que possam estar relacionados ao acúmulo de sacarose nos entrenós de cana-de-açúcar. Para tal foi executado um algoritmo de agrupamento hierárquico com os valores das razões de expressão (AS/BS) desses SASs, tal como descrito em Material e Métodos. O cluster hierárquico obtido está mostrado na Figura 2, na qual cada linha corresponde a um gene e cada dupla de colunas representa a razão AS/BS de réplicas técnicas para cada entrenó analisado. O padrão de cores reflete os níveis de indução: em vermelho estão os genes diferencialmente expressos em indivíduos contendo alto teor de sacarose, em verde os diferencialmente expressos em indivíduos contendo baixo teor de sacarose, e em preto os que não tiveram seu padrão alterado.

Essa clusterização dos dados permitiu visualizar 4 grupos distintos de padrão de expressão gênica: Grupo I – SASs diferencialmente expressos em entrenós 5 e 9 de indivíduos AS; Grupo II – SASs diferencialmente expresso em entrenó 9 de indivíduos AS; Grupo III – SASs diferencialmente expressos em entrenó 1 de indivíduos AS e Grupo IV –

SASs diferencialmente expressos em entrenós 1 e 5 de indivíduos AS.

É interessante observar que são poucos os genes que apresentaram ser diferencialmente expressos em dois tecidos. Para facilitar a visualização dessa análise, foram feitos diagramas de Venn, que possibilita identificar as intersecções entre os perfis de expressão nos tecidos (Figura 3). A primeira observação é que não há genes em comum, sendo diferencialmente expressos, nos três tecidos analisados. Nem para os indivíduos AS, e nem para os indivíduos BS. Essa constatação nos leva a crer que a maturação da cana-de-açúcar é um processo bastante complexo, sendo que há a necessidade de expressão de diversos genes envolvidos em diferentes vias metabólicas, para que ocorra o completo desenvolvimento do colmo. São poucos também aqueles expressos em dois tecidos, sendo 4 diferencialmente expressos em entrenós 1 e 5 de indivíduos AS, 2 em entrenós 1 e 9 e 5 em entrenós 5 e 9. Para os indivíduos de BS, esse número é ainda menor, caindo para apenas 1 gene diferencialmente expresso em entrenós 1 e 5, 1 e 9 e 5 e 9.

#### ***O envolvimento de teor de açúcar nas vias de sinalização***

São vários os relatos envolvendo expressão gênica mediada por açúcares. Enquanto altos níveis celulares de açúcar induzem a expressão de genes envolvidos com síntese de polissacarídeos, proteínas de estocagem e pigmentos, assim como genes associados a resposta de defesa e respiração, a falta de açúcar aumenta a expressão de genes envolvidos na fotossíntese e remobilização de recursos, tais como degradação de amido, lipídeo e proteínas (Koch, 1996; Yu, 1999; Ho et al, 2001). Por mais que o efeito regulatório de açúcares na atividade fotossintética e no metabolismo da planta tenha sido amplamente estudado, é relativamente novo o conceito de que açúcares possam agir como moléculas sinalizadoras (revisado por Rolland et al, 2002).

#### ***O possível envolvimento de $Ca^{2+}$ na sinalização por açúcar***

A calmodulina (CaM) é um conhecido sensor de  $Ca^{2+}$  que modula a atividade de diversas proteínas de mamíferos, cujos alvos em plantas estão sendo somente agora caracterizados. Há evidências de que CaM possui um importante papel na sinalização do metabolismo de carbono, no controle do desenvolvimento do cloroplasto (Bowler e Chua, 1994) e também na participação de sinalização por açúcar (Smeeckens e Rook, 1997). Pesquisas relatam o envolvimento de transdução de sinal por CaM na significativa mudança

no teor de carbono em plantas. Foi demonstrado que uma proteína CaM de petúnia foi translocada para o núcleo em resposta a deprivação de carbono (i.e. no escuro), porém associava-se a membrana plasmática na luz ou mesmo no escuro na presença de uma fonte exógena de carbono (Rodriguez-Concepcion et al, 1999). Este fato sugere que essa proteína pode estar diferenciando seu alvo celular, membrana plasmática ou núcleo, dependendo da taxa de carbono disponível na célula.

Nós identificamos 4 SASs codificantes para proteínas multifuncionais ativadas por  $\text{Ca}^{2+}$ , ligantes a calmodulina. Todas elas apresentaram-se como sendo diferencialmente expressas em entrenós de indivíduos AS. Nossos resultados sugerem que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  transiente parece ser suficiente para ativar uma cascata de sinalização ativando essas proteínas, que podem estar envolvidas com o acúmulo de sacarose encontrada nesses indivíduos.

#### *O papel de expansinas no desenvolvimento de entrenós de cana-de-açúcar*

Expansinas são proteínas que induzem a extensão da parede celular sendo consideradas como reguladoras primárias no crescimento celular da planta (Darley et al, 2001). Vários autores relataram a expressão e atividade de expansinas em tecidos em crescimento (para uma revisão veja Zenoni et al, 2004). Também foi relatada sua presença em tecidos que não estão em crescimento, como frutos maduros (Rose et al, 1997; Brummell et al, 1999; Civello et al, 1999). O envolvimento de expansinas no crescimento e modificação da parede celular tem sido estudado através de sua manipulação gênica em plantas transgênicas. Como exemplo, o silenciamento de uma alfa-expansina 1 em Petúnia levou a redução do tamanho das pétalas e também afetou a morfologia e composição da parede celular (Zenoni et al, 2004). Em nossos resultados, um gene de cana-de-açúcar codificante para uma alfa-expansina foi diferencialmente expresso em entrenó intermediário (5) em indivíduos AS. A expressão diferencial desse transcrito nesse tecido condiz com seu intenso crescimento, uma vez que esse entrenó está em pleno desenvolvimento e maturação. Também não podemos descartar a hipótese desse gene estar relacionado de alguma maneira com a alta quantidade de açúcar presente nesses tecidos nos indivíduos AS, uma vez que já foi relatada sua presença em frutos maduros.

#### *Cross-talk entre biosíntese de hormônios e sinalização por açúcar*

Sabe-se que a via de sinalização do metabolismo de carbono interage com outras

vias, incluindo a via de resposta a hormônios, dentre outros (revisado por Halford e Paul 2003). Nossos resultados condizem com essa proposta, uma vez que transcritos codificantes para genes participantes de diversas vias de biosíntese de hormônios (tais como etileno, auxina, jasmonato) foram diferencialmente expressos.

A biosíntese de etileno ocorre em dois passos enzimáticos: na primeira reação, S-adenosil metionina é convertida para ACC (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico) pela ACC sintase (ACS); e na segunda ACC é metabolizado pela ACC oxidase (ACO) para finalmente produzir etileno. Durante o amadurecimento, a expressão desses genes (ACS e ACO) e a atividade de suas enzimas governam a taxa de produção de etileno. Nesse presente trabalho foram encontrados dois transcritos para ACO diferencialmente expressos em indivíduos AS. O SAS SCJFRT1005C11.g foi diferencialmente expresso em entrenó imaturo (1) e o SAS SCVPLR2012A10.g foi diferencialmente expresso em entrenó maduro (9). Porém, apesar do etileno estar intimamente relacionado ao amadurecimento, ele parece não estar associado diretamente a regulação de níveis de açúcar, tal como proposto por Dandekar et al, (2004). Em seu trabalho, os pesquisadores relataram que frutos de maçã silenciadas para os genes ACS e ACO apresentaram-se mais firmes e com um aumento em sua meia-vida, mas não houveram diferenças significativas na taxa de açúcares avaliados (em % de sólidos solúveis – Brix). Dessa maneira, apesar de termos encontrado transcritos envolvidos diretamente na biosíntese de etileno como sendo diferencialmente expressos em entrenós em desenvolvimento de indivíduos AS de cana-de-açúcar, há a necessidade de outros experimentos afim de elucidar seu envolvimento no acúmulo de sacarose.

A sinalização por hexokinase parece afetar a expressão gênica, proliferação celular, crescimento radicular, expansão foliar e senescência. Há evidências de que a sinalização por açúcar interage com a sinalização por auxina para promover ou inibir o crescimento de determinado tecido, dependendo da sua concentração de glicose (Halford e Paul 2003). Foram encontrados dois genes codificantes para nitrilase – uma das enzimas envolvidas na síntese de auxina – como sendo diferencialmente expressos no entrenó 1 de indivíduos AS. Dessa maneira, transcritos desse gene podem estar sendo diferencialmente expressos afim de promover o crescimento celular nesse tecido.

O jasmonato (JA) é um derivado de ácido graxo de 18 carbonos (sintetizado a partir do ácido linolênico na via metabólica dos octanóides) que possui um importante papel na

defesa das plantas contra diferentes tipos de patógenos (Reymond e Farmer 1998). O primeiro passo da síntese de JA parece ser a liberação do ácido linoléico dos fosfolipídeos de membrana, sendo posteriormente convertido em ácido 13-hidroxi-linoléico, uma reação catalisada pela enzima lipoxigenase (LOX), prosseguindo com a via do MeJA (para uma revisão, veja Creelman e Mullet, 1995). Em plantas, o papel da LOX na regulação da biosíntese de JA é difícil de ser avaliada pois diversas isoformas dessa enzima possuem diferentes atividades e LOX também está presente em mais de um compartimento celular. Sabe-se que o JA modula a expressão de numerosos genes e influencia aspectos específicos do crescimento, desenvolvimento e respostas a estresses bióticos e abióticos em plantas; estando envolvido na germinação de sementes, estoque de proteínas vegetativas e desenvolvimento de flores e frutos. Ainda é incerta a existência de uma relação entre a sinalização do JA e outras vias de sinalização, porém sabe-se que a ativação mútua das vias de sinalização do etileno e do JA é essencial na expressão dos genes defensinas de plantas que codificam proteínas de papel fundamental na defesa antimicrobiana (Creelman e Mullet, 1995). É interessante observar que transcritos de genes envolvidos na via de biosíntese de JA foram diferencialmente expressos em duas diferentes análises: na primeira, um gene codificante para ácido linoléico foi mais expresso em folhas maduras de indivíduos AS de cana-de-açúcar (vide Capítulo 2) e um gene codificante para LOX apresentou uma expressão maior em entrenó imaturo em indivíduos BS. Nossos dados refletem a interação existente entre a via de sinalização do JA e açúcar, porém os mecanismos moleculares dessas interações ainda precisam ser melhor elucidados.

#### *Sinalização por açúcar e expressão de genes codificantes para proteínas PR*

Diversas pesquisas sugerem que a sinalização por açúcar e resposta a patógenos estão interligadas em algum nível. Plantas de tabaco que acumulam hexoses apresentaram um aumento na resistência a infecção por vírus (Herbers et al, 1996) e também uma indução de proteínas de resistência em plantas (PR) e acúmulo de hexose foram medidas em tabaco (Herbers et al, 2000). Jang e Sheen (1994) sugerem que o estresse causado por infecção por patógeno ou por ferimento produzem um aumento nos níveis de hexose a partir de um rápido aumento de expressão de invertases, promovendo repressão de genes envolvidos na fotossíntese e indução de genes de defesa. Essa hipótese foi debatida por Ehness et al, (1997) que propõe que glicose ativaria genes relacionados com defesa e

reprimiria genes específicos de tecidos dreno por uma via de sinalização independente da via de estresse. Recentemente, Thibaud e colaboradores (2004) demonstraram que sacarose, assim como glicose, estimulam a expressão do gene PR-2 (proteína relacionada a patogenicidade, codificante para uma  $\beta$ -1,3-glucanase). Diversos SASs codificantes para genes envolvidos com patogenicidade foram diferencialmente expressos em nossos experimentos. Quatro deles apresentaram uma expressão diferencial em entrenós de indivíduos AS (Taumatina-like e PR) e quatro em entrenós de indivíduos BS (receptores R com domínio LRR e inibidores de poligalacturonase).

Proteínas taumatina-like já foram relacionadas tanto em resposta a estresse quanto no processo de amadurecimento em frutos de uva (Davies e Robinson, 2000) e de pimenta (Kim et al, 2002). Em nossos experimentos, dois SASs codificantes para essa proteína foram diferencialmente expressos em entrenós maduros, corroborando os dados encontrados em literatura. Pode-se sugerir que a expressão desses genes esteja associada ao teor de açúcar presente nesse tecido nesses indivíduos.

Um SAS codificante para uma proteína inibidora de poligalacturonase (PGIP) foi diferencialmente expressa em entrenós intermediários e maduros de indivíduos BS. Essas glicoproteínas fazem parte da superfamília de proteínas LRR (*leucine-rich repeat*) e estão associadas a parede celular tanto de mono quanto de dicotiledôneas. A expressão desse gene é regulada durante o desenvolvimento e também em resposta a diversos estímulos de estresse, sendo que o domínio LRR está envolvido nas mais diversas funções incluindo transdução de sinal, adesão celular, desenvolvimento, reparo de DNA, recombinação, processamento e transcrição de RNA. As PGIPs possuem uma relação com diversas proteínas LRR envolvidas na resistência a patógenos e transdução de sinal (revisado por D'Ovidio et al, 2004). Sabe-se que os indivíduos de cana-de-açúcar contendo baixo teor de sacarose possuem uma maior lignificação e portanto uma maior proteção contra ataque de patógenos (nossos dados não publicados). Transcritos de PGIP podem estar sendo diferencialmente expressos nesses indivíduos para justamente garantir essa proteção ao entrenó.

#### *O controle da sinalização por açúcar mediado por fosforilações e desfosforilações*

Até o início da década de 80, a regulação do metabolismo de carboidrato era conhecida apenas pelas propriedades e funções enzimáticas e seus diferentes níveis ao

longo das vias. Hoje é sabido que a atividade da maior parte destas enzimas responde ao suprimento de carbono e energia, na sua ativação/desativação por fosforilações e ao controle de sua expressão gênica.

Proteínas MAP kinases possuem um importante papel na iniciação e coordenação de resposta a defesa em plantas a vários estímulos bióticos e abióticos, tais como seu envolvimento na resposta a elicitores (Zhang et al, 1998), frio e seca (Jonak et al, 1996), ferimento (Stratmann and Ryan, 1997), sinais endógenos (Zhang and Klessig, 1997) e recentemente Roitsch et al, (2003) relataram sua atividade na presença de açúcares. Observa-se uma certa relação existente entre a regulação fonte/dreno e resposta de defesa, mediadas por açúcares e estímulos de estresse. O fato de MAP kinases estarem envolvidas em ambas sinalizações sugere um mecanismo comum de sinal entre esses estímulos. Em nosso trabalho um SAS codificante para uma MAP kinase apresentou-se diferencialmente expresso em entrenó imaturo de indivíduos AS. Pelo menos 2 tipos de enzimas kinase estão envolvidas na fosforilação da enzima sacarose fosfato sintase (SPS): uma proteína kinase sucrose non-fermenting 1 (SNF1) de levedura; e uma proteína kinase com domínio de calmodulina (CDPK) (Smeekens 2000). A proteína kinase SNF1 de levedura está envolvida na resposta à privação de glicose, enquanto que seu homólogo em mamíferos (AMPK) está envolvido nas respostas a estresse causada pela depleção de ATP. Em plantas essa kinase parece estar envolvida na via de sinalização de açúcar (Hardie 1999), onde fosforila e inativa a SPS. Purcell et al, (1998), em análises com batatas transgênicas que expressavam SNF1 na orientação antisense, observaram uma inibição na expressão de sacarose sintase (responsável pela clivagem da sacarose) nos tubérculos destas plantas, sugerindo que as kinases SNF1 também estão envolvidas na expressão deste gene em plantas. É interessante observar que PP2A e PP2C de mamíferos possuem a capacidade de inativar a atividade das SNF1 kinases de plantas. Além de regular negativamente essa via, a subunidade tipo 2A da PP2C é capaz de desfosforilar e ativar a enzima SPS, diminuindo a concentração de Pi (revisado por Winter e Huber 2000).

*O possível envolvimento de receptores serina/treonina quinase na sinalização por açúcar*

A grande maioria das vias de transdução de sinal engloba uma cascata de fosforilação e desfosforilação de proteínas, catalisada pelas proteínas quinases e fosfatases,

respectivamente. A ativação dessas cascatas medeia respostas a estímulos distintos, como luz, ataque por patógenos, reguladores de crescimento, estresses variados e deprivação de nutrientes, que são percebidos por receptores. Um enorme progresso tem sido feito nos últimos anos com a caracterização de 4 ligantes de receptores de quinases (RLK- *receptor-like kinase*) envolvidos em processos tão diversos como a rejeição do próprio pólen, diferenciação no meristema do broto, a resposta a hormônios brassinosteróides e a resposta inata a patógenos bacterianos (Johnson e Ingram, 2005). Dentre as RLKs conhecidas, a subfamília de receptores LRR foram as melhores caracterizadas até o momento. Sabe-se que os receptores quinase são responsáveis pela associação a outros fatores que serão translocados para o núcleo para então ativar as mudanças necessárias na expressão gênica (Hardie 1999). Interessante observar que um SAS codificante para um receptor serina/treonina quinase também demonstrou-se como diferencialmente expresso em folhas maduras de indivíduos AS (vide capítulo 2). Desta maneira, a expressão diferencial desses transcritos do receptor serina/treonina quinase encontrada nos microarrays pode estar refletindo em uma possível ativação de uma cascata de sinalização celular que seria responsável por uma maior produção/acúmulo de sacarose nesses indivíduos.

*Expressão de proteínas de resposta a estresse em indivíduos segregantes para teor de açúcar*

Neste trabalho uma grande quantidade de transcritos codificantes para proteínas envolvidas em resposta a estresse foram diferencialmente expressos. Tal como discutido anteriormente, o baixo teor de açúcar parece aumentar a expressão de genes envolvidos na fotossíntese, enquanto que sua abundância parece promover a expressão de genes envolvidos no crescimento, estocagem de carboidratos e estresse (Koch, 1996, Rolland et al, 2002). Estresse causado por mudanças no potencial osmótico podem ocorrer durante tratamentos a baixas temperaturas, infecção por patógeno, seca, salinidade e também durante a acumulação de grandes quantidades de substâncias osmoticamente ativas em tecidos de estocagem, tais como frutos de uva (Davies e Robinson, 2000) e entrenós de cana-de-açúcar. Durante a maturação da cana, as células se expandem rapidamente para acumular grandes quantidades de açúcares e água, resultando em uma considerável mudança na pressão osmótica. Seus entrenós tornam-se vulneráveis com essa mudança devido a grande quantidade de açúcares estocada, levando a um aumento na expressão de

genes ou na síntese de proteínas envolvidas na resposta a estresse. O aumento na expressão de genes envolvidos na resposta a estresse osmótico também foi observado em frutos de uva (Davies e Robinson, 2000), que assim como os entrenós de cana, acumulam grandes quantidade de açúcares. Dessa maneira, nossos resultados corroboram com a hipótese de envolvimento de genes de resposta à desidratação no acúmulo de açúcar nos entrenós. Ho et al (2001) sugerem que a privação de açúcar pode ser considerada como um tipo de estresse nutricional. Pode-se questionar o fato de que níveis alterados de açúcar, tanto sua privação como seu acúmulo, pode causar uma resposta de estresse na célula. E de fato, a expressão diferencial de tantos genes envolvidos nessa resposta poderia estar aumentando a proteção celular contra esse estresse. É importante ressaltar que genes envolvidos com estresse também foram diferencialmente expressos em folhas maduras de indivíduos de baixo teor de açúcar em nossos resultados anteriores (vide capítulo 2). Seria de grande interesse fazer uma análise mais aprofundada do envolvimento desses genes na sinalização por açúcar em cana.

*Envolvimento de genes pertencentes às categorias de transcrição e ubiquitinação em resposta à açúcar*

Pouco se sabe a respeito dos fatores *cis* e *trans* que participam das etapas finais da sinalização por açúcar em plantas. Até hoje, foram identificados apenas cinco elementos *cis* em promotores de planta regulados por açúcar: SURE (*sugar-responsive* Grierson et al, 1994); SP8 (Ishiguro e Nakamura, 1994), TGGACGG (Maeo et al, 2001), G-box (Giuliano et al, 1988), e B-box (Grierson et al, 1994; Zourelidou et al, 2002). E somente três prováveis fatores de transcrição que parecem envolvidos na sinalização por açúcar foram isolados (SPF1- Ishiguro and Nakamura 1994; STK - Zourelidou et al, 2002 e SUSIBA2 – Sun et al, 2003). SPF1 liga-se a sequencia de SP8, funcionando como um repressor, STK liga-se ao B-box funcionando como um ativador e SUSIBA2 liga-se a elementos SURE atuando como ativador. Todos eles estão envolvidos de alguma maneira na regulação da síntese de amido em plantas.

Diversos SASs codificantes para fatores de transcrição foram diferencialmente expressos em nosso trabalho. Sabe-se que muitos dos genes envolvidos no metabolismo de carboidrato, tais como proteínas quinases, fosfatases, e mensageiros secundários como  $Ca^{2+}$  são regulados por açúcar em níveis transcricionais. Porém pouco se sabe em como os

fatores de transcrição possam estar envolvidos na regulação da síntese de sacarose em plantas.

A degradação de proteínas específicas através da via de ubiquitina é um processo regulado que envolve a atividade de diversas enzimas (Belknap e Garbarino, 1996). Essas proteínas ocorrem em todos os eucariotos como um monômero livre ou covalentemente ligado a uma variedade de outras proteínas. Uma de suas principais funções está na ligação a proteínas que serão degradadas seletivamente através do proteossomo 26S. Similarmente aos nossos resultados, transcritos de poliubiquitina apresentaram uma maior expressão em entrenós maduros de cana-de-açúcar, em um trabalho desenvolvido por Carson et al, (2002). Mas até onde sabemos, não há relatos da indução da expressão gênica dessas proteínas em resposta à açúcar. Porém, tal como já discutido anteriormente, o acúmulo de açúcar em entrenós maduros pode estar causando um estresse para a planta. Nogueira et al, (2003) relataram a expressão diferencial dessas proteínas frente a tratamentos de frio em cana-de-açúcar. Dessa maneira, pode-se inferir que o estresse causado pelo teor de açúcar encontrado nessas plantas possa estar ativando a expressão dessas proteínas em cana-de-açúcar.

#### ***Validação do perfil de expressão gênica***

A partir das clusterizações e dos diagramas de Venn foi feita uma análise mais refinada do perfil de expressão desses genes diferencialmente expressos, para posterior validação. Optou-se por escolher 20 SASs que apresentassem uma expressão diferencial em pelo menos um tecido analisado, tanto para os indivíduos AS, como também para os indivíduos BS (Tabela 2).

Quatro desses SASs tiveram sua expressão validada por RNA blot (Figura 4): uma proteína quinase induzida por ABA (SCACLR2007G02.g), glutatona S-transferase (SCAGFL1089C03.g), glicina hidroximetiltransferase (SCCCLR1022F10.g) e uma proteína desconhecida (SCSGSB1009D11.g). Pode-se observar na figura 4 que esses quatro genes escolhidos apresentaram o mesmo perfil de expressão observado nos *microarrays*.

Os dados apresentados nesse capítulo sugerem um possível envolvimento de genes de resposta a estresse na sinalização por açúcar, visto a quantidade de genes diferencialmente expressos presentes nessa categoria. Foi possível validar quatro genes em RNA blot. Porém vale ressaltar que essas validações foram feitas com as mesmas amostras de RNA utilizadas nas hibridações dos *microarrays*. Dessa forma, esse resultado não pode ser considerado como uma validação biológica, mas sim apenas como técnica. Para termos certeza da expressão diferencial observada nesses genes alvos, optou-se por repetir as coletas nesse ano (2006) e validar esses dados tanto nas amostras de entrenós bulkadas, como também nos sete indivíduos separadamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ablett EG, Seaton K, Scott D, Shelton MW, Graham P, Baverstock L S, Lee R. 2000. Analysis of grape ESTs: global gene expression patterns in leaf and berry. *Plant Science* 159: 87-95.

Altschul et al, 1997. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.

Bachmann M, Huber JL, Athwal GS, Wu K, Ferl RJ, Huber SC. 1996. 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS Lett.* 398: 26-30.

Belknap WR, Garbarino JE. 1996. The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses. *Trends Plant Sci.* 10:331–335.

Bowler C, Chua NH. 1994. Emerging themes of plant signal transduction. *The Plant Cell* 6:1529–1541.

Brummell DA, Harpster MH, Dunsmuir P. 1999. Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Mol Biol* 39: 161-169.

Carson DL, Hockett BI, Botha FC. 2002. Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue. *Plant Science* 162: 289-300.

Casu RE, Grof CPL, Rae AL, McIntyre CL, Dimmock CM, Manners JM. 2003. Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. *Plant Molecular Biology* 52:371-386.

Casu RE, Dimmock CM, Chapman SC, Grof CPL, McIntyre CL, Bonnett GD, Manners JM. 2004. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. *Plant Molecular Biology* 54: 503-517.

Civello PM, Powell ALT, Sabehat A, Bennett AB. 1999. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology* 121: 1273–1279.

Creelman RA, Mullet JE. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants:

regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4114-4119.

Dandekar AM, Teo G, Defilippi BG, et al, 2004. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic Research* 13:373-384.

Darley CP, Forrester AM, McQueen-Mason SJ. 2001. The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Mol Biol.* 47:179-95.

Davies C, Robinson SP. 2000. Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiology* 122:803–812.

D'Ovidio R, Raiola A, Capodicasa C, Devoto A, Pontiggia D, Roberti S, Galletti R, Conti E, O'Sullivan D, De Lorenzo G. 2004. Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects. *Plant Physiol.* 135:2424–2435.

Ehness R, Roitsch T. 1997. Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *Plant Journal* 11:539-548.

Ehness R, Ecker M, Godt DE, et al, 1997. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* 9: 1825-1841.

Gilbert GA, Wilson C, Madore MA. 1997. Root-zone salinity alters raffinose oligosaccharide metabolism and transport in *Coleus*. *Plant Physiology* 115:1267-1276.

Giuliano G, Pichersky E, Malik VS, Timko MP, Scolnik PA, Cashmore AR. 1988. An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:7089-93

Grierson C, Du JS, de Torres Zabala M, Beggs K, Smith C, Holdsworth M, Bevan M. 1994. Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant J.* 5:815-26.

Gucci R, Moing A, Gravano E, Gaudillere JP. 1998. Partitioning of photosynthetic carbohydrates in leaves of salt-stressed olive plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 25:571-579.

Halford NG, Dickinson JR. 2001. Sugar sensing and cell cycle control: evidence of

cross-talk between two ancient signalling pathways. In: Francis D, ed. The plant cell cycle and its interfaces. Sheffield: Sheffield Academic Press, 87–107.

Halford NG, Paul MJ. 2003. Carbon metabolite sensing and signalling. *Plant Biotechnology Journal* 1:381-398.

Hardie DG. 1999. Plant protein serine threonine kinases: Classification and functions. *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol* 50:97-131.

Herbers K, Meuwly P, Métraux J-P, Sonnewald U. 1996. Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf development stage. *FEBS Letters* 397:239–244.

Herbers K, Takahata Y, Melzer M, Mock HP, Hajirezaei M, Sonnewald U. 2000. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Molecular Plant Pathology* 1:51–59.

Ho SL, Chao YC, Tong WF, et al, 2001. Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. *Plant Physiol* 125: 877-890.

Ishiguro S, Nakamura K. 1994. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato. *Mol Gen Genet.* 244:563-71.

Jacobsen KR, Fisher DG, Maretzki A, Moore PH. 1992. Developmental changes in the anatomy of the sugarcane stem in relation to phloem unloading and sucrose storage. *Botanica Acta* 105:70-80.

Jang JC, Sheen J. 1994. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6:1665–1679.

Johnson KL, Ingram GC. 2005. Sending the right signals: regulating receptor kinase activity. *Current Opinion in Plant Biology* 8:648-656.

Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W, Barker PJ, Huskisson NS, Hirt H. 1996. Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93:11274–11279.

Kim YS, Park JY, Kim KS, et al, 2002. A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation. *Plant Mol Biol* 49:125-135.

Koch KE, Wu Y, Xu J. 1996. Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose

metabolism: Potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning and sugar sensing. *Journal of Experimental Botany* 47:1179-1185.

Maeo K, Tomiya T, Hayashi K, Akaike M, Morikami A, Ishiguro S, Nakamura K. 2001. Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for beta-amylase of sweet potato. *Plant Mol Biol* 46:627-37.

Moore PH. 1995. Temporal and spatial regulation of sucrose accumulation in the sugarcane stem. *Australian Journal of Plant Physiology* 22:661-679.

Moore PH. 2005. Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: towards developing an understanding of the gene-to-crop continuum. *Field Crops Res* 92:119-135.

Moorhead G 1996. Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J.* 18: 1-12.

Nam YW, Tichit L, Leperlier M, et al, 1999. Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. *Plant Mol Biol* 39:629-636.

Nogueira FTS, De Rosa VE, Menossi M, Ulian EC, Arruda, P. 2003. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiol* 132: 1811-1824.

Papini-Terzi FS , Rocha FR , Vêncio RZN, Oliveira KC, Felix JM, Vicentini R, Rocha CS, Simões ACQ, Ulian EC, di Mauro SMZ, Da Silva AM, Pereira CAB, Menossi M, Souza GM. 2005. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. *DNA Research* 12:27-38.

Purcell LC, de Silva M, King CA, Kim WH. 1998. Biomass accumulation and allocation in soybean associated with differences in tolerance of nitrogen fixation to water deficits. *Plant Soil* 196:101–113.

Reymond P, Farmer EE. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* 1:404-411.

Roitsch T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2:198-206.

Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK. 2003. Extracellular invertase: Key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.* 54:513–524.

- Rolland F, Moore B, Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14:S185-S205.
- Rose M, Albig W, Entian KD. 1991. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinase-PI and hexokinase-PII. *Eur Jour Bioc* 199:511-518.
- Rose JKC, Lee HH, Bennett AB. 1997 Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94: 5955-5960.
- Smeekens S, Rook F. 1997. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol* 115: 7-13.
- Smeekens S. 2000. Sugar-induced signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 51:49–81.
- Souza GM, Simoes ACQ, Oliveira KC, Garay HM, Fiorini LC, Gomes FD, Nishiyama-Junior MY, da Silva AM. 2001. The sugarcane signal transduction (SUCAST) catalogue: prospecting signal transduction in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology* 24:25-34.
- Stratmann JW, Ryan CA. 1997. Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11085-11089.
- Sun CX, Palmqvist S, Olsson H, et al, 2003. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. *Plant Cell* 15:2076-2092.
- Thibaud MC, Gineste S, Nussaume L, et al, 2004. Sucrose increases pathogenesis-related PR-2 gene expression in *Arabidopsis thaliana* through an SA-dependent but NPR1-independent signaling pathway. *Plant Physiol Bioch* 42: 81-88.
- Toroser D, Huber SC. 1997. Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic stress activation of sucrose-phosphate synthase in spinach leaves. *Plant Physiol.* 114: 947-955.
- Van Dillewijn C. 1952. Botany of sugarcane, first edition. EUA.
- Welbaum GE, Meinzer FC. 1990. Compartmentation of solutes and water in developing sugarcane stalk tissue. *Plant Physiology* 93, 1147–1153.
- Winter H, Huber SC. 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19:31-67.

Yu SM 1999. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. *Plant Physiol* 121: 687-693.

Zenoni S, Reale L, Torielli GB, Lanfaloni L, Porceddu A, Ferrarini A, Moretti C, Zamboni A, Speghini A, Ferranti F, Pezzoti M 2004. Downregulation of the petunia hybrida  $\alpha$ -expansin gene PhEXP1 reduces the amount of crystalline cellulose in cell walls and leads to phenotypic changes in petal limbs. *Plant Cell* 16: 295–308.

Zhang SQ, Klessig DF. 1998 The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7225-7230.

Zhang S, Klessig DF. 1997. Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9:809-824.

Zhu-Salzman K, Shade RE, Koiwa H, Salzman RA, Narasimhan M, Bressan IA, Hasegawa PM, Murdock LL. 1998. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of Griffonia simplicifolia lectin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15123-15128.

Zourelidou M, de Torres-Zabala M, Smith C, Bevan MW. 2004. Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *Plant J.* 30:489-97.

## LEGENDAS

**Tabela 1. ESTs de cana-de-açúcar que apresentaram padrão de expressão diferencial entre indivíduos de alto e baixo teor de sacarose em entrenós em desenvolvimento.** Nesta tabela encontram-se os genes diferencialmente expressos em pelo menos um tecido analisado: entrenó 1 (En1), entrenó 5 (En5) e entrenó 9 (En9). Em vermelho estão aqueles diferencialmente expressos nos indivíduos de alto teor de sacarose e em verde estão os que foram diferencialmente expressos nos indivíduos de baixo teor de sacarose. A similaridade protéica foi obtida utilizando a matriz BLOSUM62 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Tabela 2. ESTs de cana-de-açúcar a serem validados por Real Time PCR.** Nesta tabela encontram-se os genes diferencialmente expressos em pelo menos um tecido analisado: entrenó 1 (E1), entrenó 5 (E5) e entrenó 9 (E9), escolhidos para validação. Em vermelho estão aqueles diferencialmente expressos nos indivíduos de alto teor de sacarose e em verde estão os que foram diferencialmente expressos nos indivíduos de baixo teor de sacarose. a: Sugarcane Assembled Sequences. A similaridade protéica, número de acesso do homólogo e seu respectivo valor de e-value foram obtidos utilizando a matriz BLOSUM62 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Figura 1. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos.** Um total de 88 SASs diferencialmente expressos nos entrenós foram classificados de acordo com sua anotação funcional do projeto SUCAST. (A) Distribuição funcional de genes diferencialmente expressos em entrenós de indivíduos contendo alto teor de sacarose; (B) genes mais expressos em indivíduos contendo baixo teor de sacarose

**Figura 2. Clustering hierárquico dos genes diferencialmente expressos em entrenós em desenvolvimento em indivíduos segregantes para teor de açúcar.** Cada dupla de colunas representa a razão AS/BS de réplicas técnicas para cada entrenó analisado: entrenó 1, 5 e 9 (En1, En5 e En9 respectivamente). Em vermelho estão os genes diferencialmente expressos em indivíduos contendo alto teor de sacarose (AS), em verde os diferencialmente expressos em indivíduos contendo baixo teor de sacarose (BS), e em preto os que não tiveram seu

padrão alterado. Os grupos em destaque estão discutidos no texto.

**Figura 3. Diagrama de Venn para intersecção entre entrenós em desenvolvimento.** Cada diagrama mostra intersecções entre genes que foram diferencialmente expressos em amostras de entrenós 1, 5 e 9 de indivíduos de alto (A) e baixo (B) teor de açúcar. Para ambas análises não houve genes diferencialmente expressos nos três tecidos analisados (em branco no diagrama). Em destaque estão os genes diferencialmente expressos em comum entre os tecidos.

**Figura 4. Validação por RNA blot dos genes diferencialmente expressos.** Observa-se nos gráficos a comparação das razões dos níveis de expressão observados nos microarranjos e nos RNA blots. Os valores correspondem às razões para cada tecido/experimento. AS/BS: alto teor de sacarose/ baixo teor de sacarose; E1, E5 e E9: numeração dos entrenós analisados.

**Tabela 1.**

Categoria	SAS	Blast hit	En1	En5	En9
<i>Calcium</i>					
	SCEZLB1012F10.g	Calmodulin-binding proteins GNGC family	■		
	SCEQLR1007G03.g	Elongation factor 1 alpha		■	
	SCAGLR1043F02.g	Calmodulin-binding proteins HSP70s (heat shock)			■
	SCCCL3120G07.g	Calmodulin-binding proteins HSP70s (heat shock)			■
<i>Development</i>					
	SCQGR1040G03.g	Alpha-expansin		■	
<i>Hormone biosynthesis</i>					
	SCJFRT1005C11.g	ACC oxidase	■		
	SCCCL6002B05.g	Nitrilase	■		
	SCRFLR1012D12.g	Nitrilase	■		
	SCEQRT1024E12.g	Phenylalanine ammonia-lyase	■		
	SCVPLR2012A10.g	Ethylene - 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase			■
	SCCCAM2004G02.g	Auxin transport / auxin efflux carrier			■
	SCCCTR1001E01.g	Lipoxygenase	■		
	SCJFRT1007H07.g	Lipoxygenase	■		
<i>Inositol</i>					
	SCCCLR1C02F07.g	Myo-inositol 1-phosphate synthase	■		
	SCRULB1060F05.g	1-Phosphatidylinositol 4-kinase		■	
<i>No matches</i>					
	SCCST1001C04.g	No matches			■
	SCAGFL1089G08.g	No matches		■	
	SCRULB2065G10.g	No matches		■	
	SCCCLR1C04C02.g	No matches	■		
<i>Others</i>					
	SCCCAM2040G08.g	Putative leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	■		
	SCUTRZ2022G04.g	Putative heat shock protein 82	■	■	
	SCRFLR1012F12.g	Caffeic acid 3-O-methyltransferase			■
	SCCCLR2002E04.g	Putative Bet v I pollen allergen	■		
	SCVPLR2005G05.g	Putative Mobi/phoein family protein	■		
	SCCCLR1022F10.g	Glycine hydroxymethyltransferase		■	
	SCCCLR1001A06.g	Extensin-like protein			■
	SCUTST3090E03.g	Unknown protein			■
	SCQGHR1010D02.g	Putative terpene synthase	■		
	SCCCRZ1002H08.g	Saposin B domain-containing protein		■	
	SCJFRZ2034D04.g	SET-domain transcriptional regulator		■	
<i>Pathogenicity</i>					
	SCEQRT1028C03.g	Pathogenesis-related protein	■		■
	SCBGLR1023D05.g	Zinc finger protein LSD1	■		
	SCCSD1003E02.g	Protease inhibitors - thaumatin-like protein			■
	SCCSD2001E05.g	Protease inhibitors - thaumatin-like protein			■
	SCJFRZ3C03H08.g	R-genes (receptors) With LRR		■	
	SCCCLR1065F03.g	R-genes (receptors) With LRR / NBS-LRR		■	
	SCEQRT2098H06.g	R-genes (receptors) With LRR / NBS-LRR		■	
	SCSFAD1125C08.g	Polygalacturonase-inhibiting		■	■
<i>Protein kinases</i>					
	SCACLR2007G02.g	Abscisic acid-inducible protein kinase	■		
	SCRFLR1034G06.g	Abscisic acid-inducible protein kinase	■		
	SCSBAM1084E01.g	Mitogen-activated protein kinase (MAPK)	■		
	SCCCLR1C05G07.g	S-adenosylmethionine decarboxylase			■
	SCBFSB1047C02.g	Aluminium induced protein		■	
	SCEZLR1031G10.g	Cell cycle-related CDC2 / CRK2		■	
	SCCCLR2C01G07.g	SNF1-related			■
	SCMCRT2103B04.g	SNF1-related			■
	SCMCS2061D05.g	Putative Serine/threonine kinase			■
	SCVPRT2081G05.g	Cell cycle-related CRK1 protein		■	
	SCCCLB1003E11.g	Protein kinase REK		■	
<i>Protein Phosphatases</i>					
	SCEZHR1088E02.g	Tyrosine Phosphatases - Dual Specificity Protein Phosphatases			■
	SCEPRZ1010E06.g	PPM Family PP2C-like			■

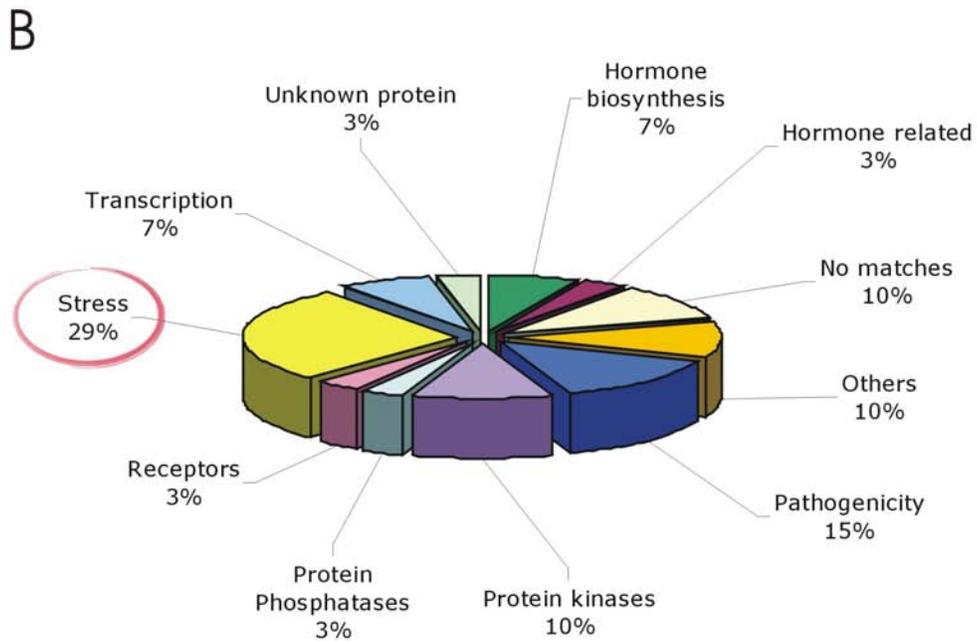
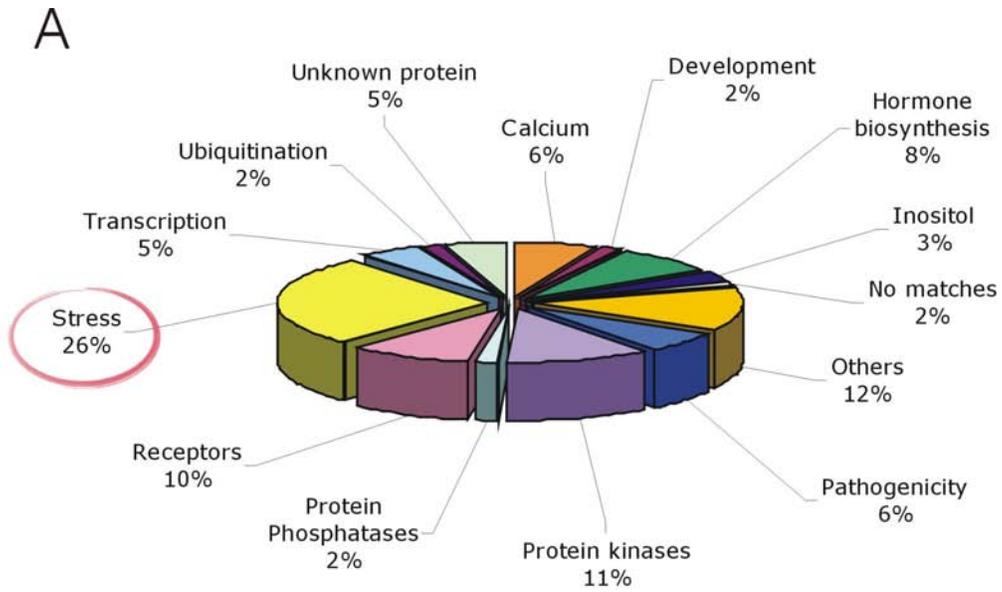
**Tabela 1. Continuação**

Categoria	SAS	Blast hit	En1	En5	En9
<i>Receptors</i>					
	SCEPLR1030E06.g	Receptor Ser/Thr kinase RLK undefined with LRR	■		
	SCCFL4094H12.g	Receptor Ser/Thr kinase		■	
	SCCCLR1024A02.g	Receptor Ser/Thr kinase			■
	SCEZHR1047A01.g	Receptor Ser/Thr kinase RLK undefined with LRR			■
	SCVPCL6041F01.g	Receptor Ser/Thr kinase RLK with lectin domain			■
	SCBFFL4114B06.g	Receptor Ser/Thr kinase RLK Undefined		■	
<i>Stress</i>					
	SCSBHR1052E03.g	ABA and stress induced	■		
	SCUTST3084F06.g	Low temperature and salt responsive protein (LTI)	■	■	
	SCACCL6008H06.g	Low temperature and salt responsive protein (LTI)		■	
	SCJLRT1016G06.g	S-like Rnase			■
	SCAGFL1089C03.g	Glutathione S-transferases			■
	SCCCLR2C01F06.g	Wound-induced			■
	SCCCLR1024C03.g	Drought and cold response putative aquaporin			■
	SCCCR21001F02.g	Drought and cold response putative aquaporin			■
	SCCCR21002E08.g	Drought and cold response putative aquaporin			■
	SCCST3001H12.g	Drought and cold response putative aquaporin			■
	SCEQRT2100B02.g	Drought and cold response putative aquaporin			■
	SCBFFL5074C09.g	Drought and cold response reversibly glycosylated polypeptide			■
	SCCCL3002C09.b	Glutathione S-transferases			■
	SCCAD1001C08.g	Peroxidases P7X			■
	SCRFHR1009G06.g	Putative dehydration-responsive protein			■
	SCQGLR1085F11.g	Dehydrin - Drought-induced			■
	SCEPRZ3087C08.g	Low temperature and salt responsive protein (LTI)		■	
	SCEQRT1026H08.g	Cytochrome P450 CYP75	■		
	SCAGLR1043E04.g	Cytochrome P450 CYP74A			■
	SCJLRT1021D12.g	Chalcone synthase	■		
	SCVPLR2027D02.g	Chalcone synthase	■		
<i>Transcription</i>					
	SCUTLR2023D06.g	CCAAT-box transcription factor complex WHAP			■
	SCCCLR1066G08.g	HGM (High mobility group protein)			■
	SCEPRZ1008F02.g	Transcription factor LIM (protein-protein interaction)			■
	SCEZST3147A10.g	Zinc finger proteins C3H			■
	SCEZLB1010E10.g	Auxin-response factors	■		
<i>Ubiquitination</i>					
	SCJFRT2055G07.g	Polyubiquitin			■
<i>Unknown protein</i>					
	SCVPLR1049B12.g	Unknown protein	■		
	SCEZRZ1015G02.g	Putative protein kinase			■
	SCSGSB1009D11.g	Unknown protein			■
	SCCCLR2002H11.g	Unknown protein		■	

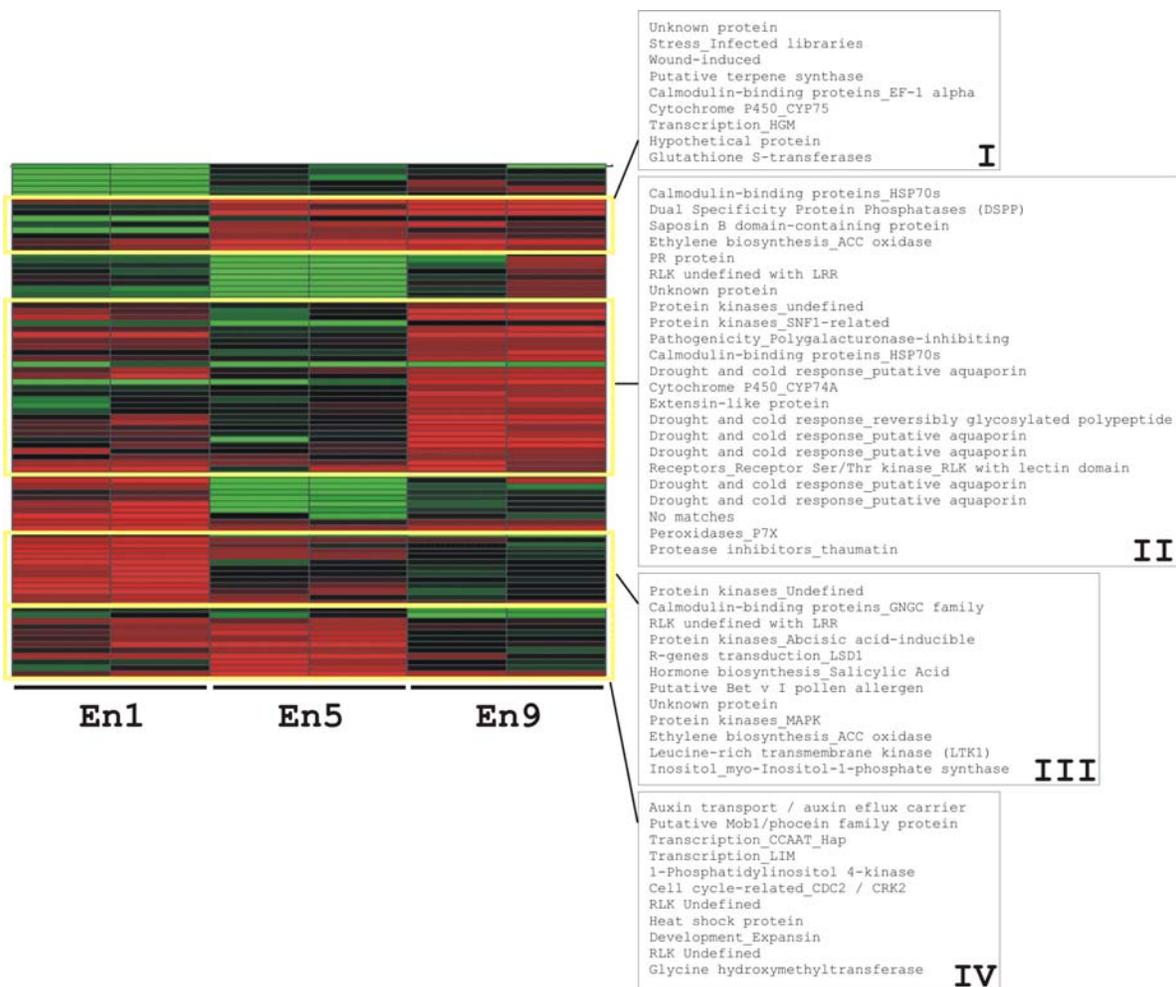
**Tabela 2.**

Categoria	SAS <sup>a</sup>	Descrição do homólogo <sup>b</sup>	Número de acesso do homólogo <sup>c</sup>	E value <sup>d</sup>	Expressão em indivíduos AS		
					E1	E5	E9
Others	SCUTRZ2022G04.g	Heat shock protein	BAD73668	1E-71	■	■	■
Protein kinases	SCACLR2007G02.g	Abcisic acid-inducible	NP_914767	9E-34	■	■	■
Stress	SCACCL6008H06.g	Drought and cold response	AAS72306	6E-24	■	■	■
Stress	SCJLRT1016G06.g	Wound-induced	AAS01727	1E-105	■	■	■
Others	SCRFLR1012F12.g	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	AAQ67347	0.0	■	■	■
Pathogenicity	SCEQRT1028C03.g	R-genes transduction	AAW83209	9E-68	■	■	■
Hormone biosynthesis	SCEQRT1024E12.g	Salicylic Acid	XP_466845	0.0	■	■	■
Receptors	SCEPLR1030E06.g	Receptor Ser/Thr kinase	NP_915025	2E-132	■	■	■
Stress	SCEQRT1026H08.g	Cytochrome P450	AAV74195	0.0	■	■	■
Stress	SCAGLR1043E04.g	Cytochrome P450	AAR33048	0.0	■	■	■
Stress	SCAGFL1089C03.g	Glutathione S-transferases	AAA72758	3E-86	■	■	■
Stress	SCCCLR2C01F06.g	Wound-induced	CAA42537	2E-17	■	■	■
Unknown protein	SCSGSB1009D11.g	Unknown protein	BAD32025	1E-04	■	■	■
Others	SCCCLR1022F10.g	Glycine hydroxymethyltransferase	NP_193129	0.0	■	■	■
Others	SCJFRZ2034D04.g	SET-domain protein	AAO32935	2E-108	■	■	■
Pathogenicity	SCJFRZ3C03H08.g	R-genes (receptors)	NP_917553	2E-58	■	■	■
Pathogenicity	SCEQRT2098H06.g	R-genes (receptors)	ABA96072	1E-38	■	■	■
Protein Phosphatases	SCEZHR1088E02.g	Tyrosine Phosphatases	ABA91347	4E-140	■	■	■
Stress	SCCCRZ1002E08.g	Drought and cold response	AAO86706	2E-158	■	■	■
Stress	SCCCLR1024C03.g	Drought and cold response	AAO86709	8E-102	■	■	■

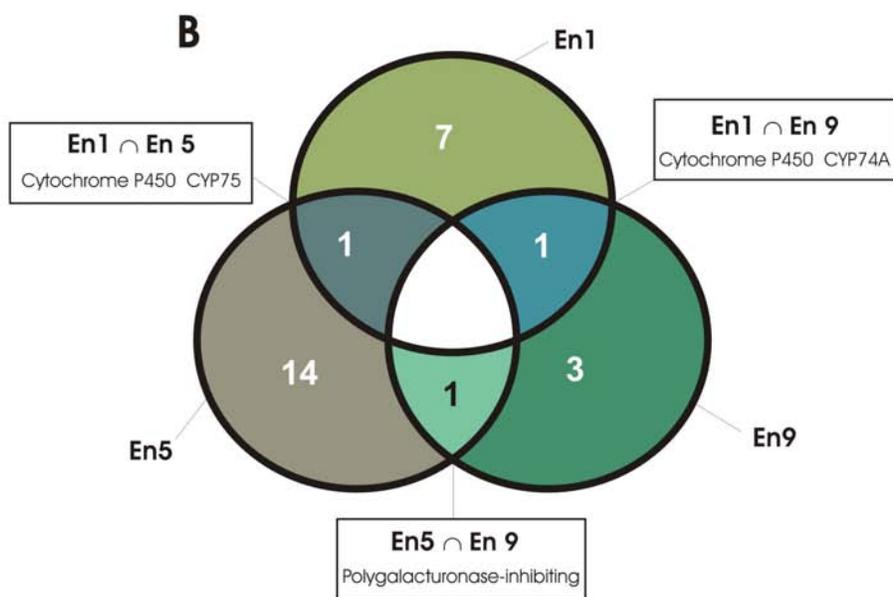
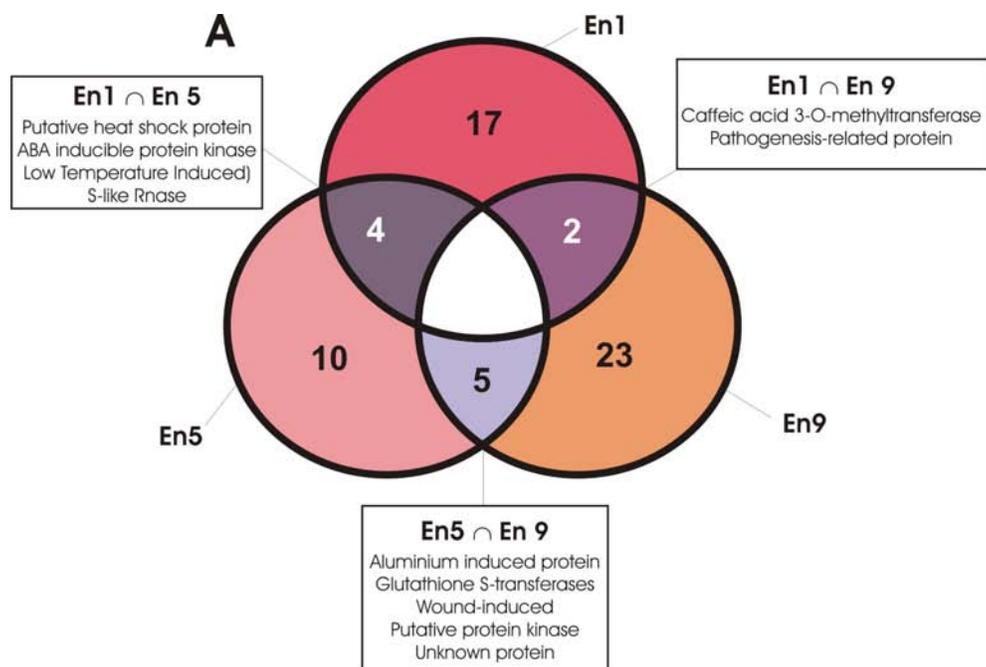
Figura 1.



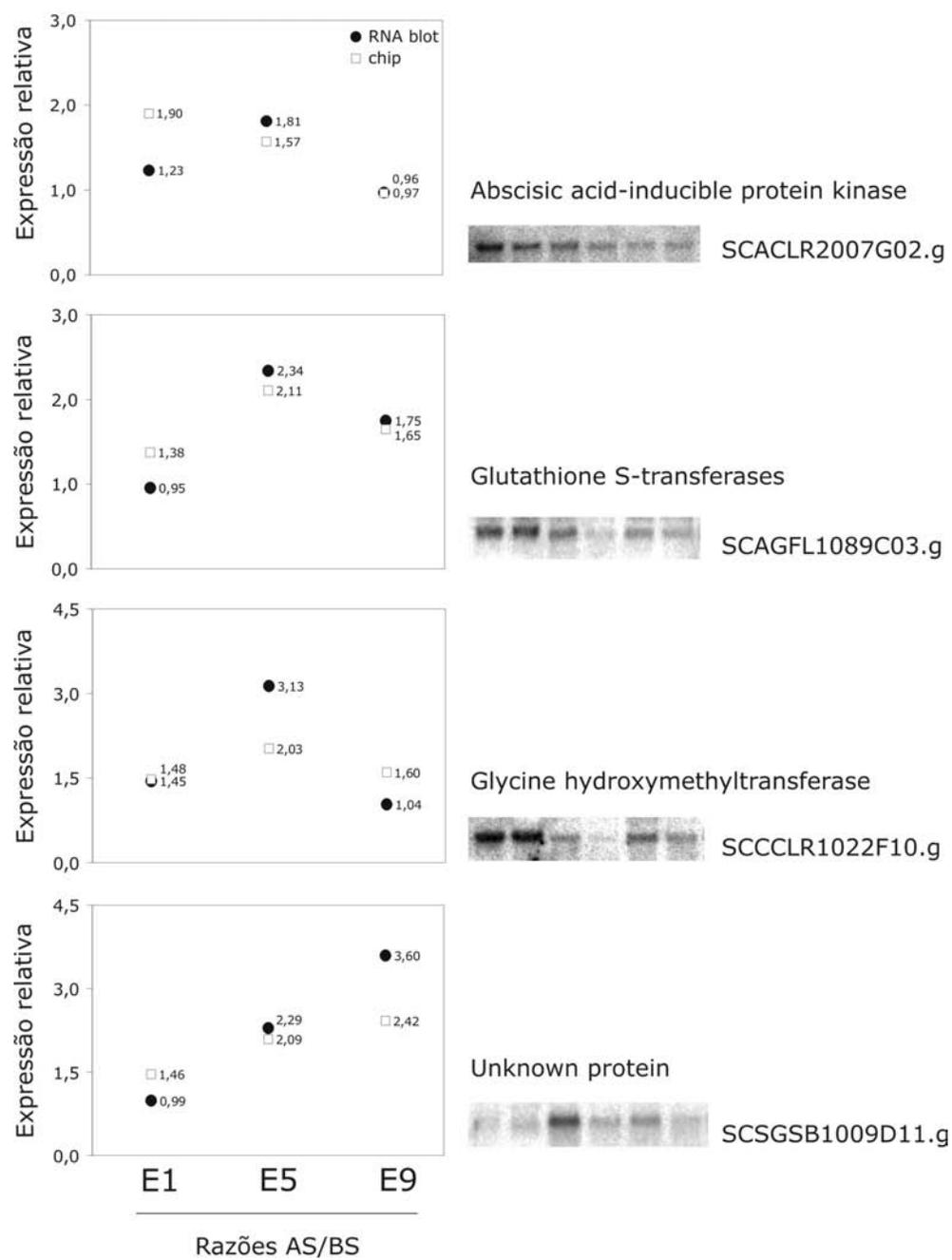
**Figura 2.**



**Figura 3.**



**Figura 4.**



## *Capítulo IV*

---

*Identificação e caracterização de transportadores de açúcar e seu possível envolvimento no acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar*

**Juliana de Maria Felix, Renato Vicentini, Marcelo C. Dornelas, Eugênio César Ulian, Marcelo Menossi**

## RESUMO

As plantas possuem diversos transportadores de açúcar, divididos em mono e dissacarídeos. Essas proteínas possuem diferentes funções no carregamento e/ou descarregamento no floema ou na importação de sacarose nos tecidos dreno. Neste artigo será abordada a identificação e análise de expressão de 13 prováveis transportadores de açúcar de cana. Nove deles foram identificados como transportadores de monossacarídeo e os outros quatro como sendo prováveis transportadores de dissacarídeo. Foi feita a análise de expressão por RNA-blot utilizando folha madura e entrenós maduros e imaturos de uma população de cana-de-açúcar segregante para o teor de sacarose. Esses transportadores apresentaram uma expressão diferencial entre os entrenós e também ao longo da maturação, porém não foi encontrada correlação entre sua expressão e o acúmulo de sacarose. Em uma análise espacial foi visto que alguns são expressos somente em tecidos dreno, enquanto outros também são diferencialmente expressos em tecido fonte, como folha madura. Em análises *in situ* de três transportadores (*SsMST1*, *SsGlcT* e *SsPST3*) foi observada a localização desses transcritos no parênquima vascular, células companheiras do floema e também nas células proximais do parênquima do floema e protoxilema de entrenós imaturos, sugerindo seu envolvimento na translocação do açúcar. Este estudo sugere que esses transportadores de açúcar possuem diversas funções tanto nos tecidos fonte quanto dreno, e também nos diferentes estágios de maturação da cana-de-açúcar. Este é o primeiro passo para identificar o envolvimento entre os transportadores de açúcar e o acúmulo de sacarose em cana.

## INTRODUÇÃO

As células vegetais produzem carboidratos através da fixação do CO<sub>2</sub> durante a fotossíntese. Porém, nem todas as células são fotossinteticamente ativas, tais como as células radiculares, estruturas reprodutivas, órgãos em desenvolvimento e tecidos de estocagem, que precisam importar o carboidrato que foi sintetizado em outras partes da planta. A folha adulta é o local predominante de fotossíntese, produzindo carboidratos que serão exportados para as outras partes da planta. Desta maneira, esses tecidos exportadores de carboidrato são conhecidos como fonte (*source*) e os importadores como dreno (*sink*) (Williams et al, 2000).

Após sua síntese, a sacarose pode ser transportada das células do mesófilo até as células companheiras (CC), localizadas no simplasto, movendo-se de célula por célula via plasmodesmatas (conhecido como carregamento simplástico). Porém, ela também pode ser carregada ativamente do apoplasto para as CC (conhecido como carregamento apoplástico). Para tal processo é fundamental o papel dos transportadores de açúcar. O descarregamento da sacarose nos tecidos drenos também pode ocorrer tanto simplasto quanto apoplasticamente. A escolha de rota depende da espécie, do órgão, do tecido e do estágio de desenvolvimento da planta. As células dreno podem importar a sacarose diretamente do apoplasto, via transportadores dissacarídeos (DST); ou alternativamente a sacarose pode ser hidrolisada em glicose e frutose pelas enzimas invertases, para então ser importada via transportadores monossacarídeos (MST) (Williams et al, 2000; Buttner e Sauer 2000).

### *O floema é composto por diferentes tipos de células*

Para entender o transporte de solutos nas plantas, é necessária uma breve introdução à estrutura do floema, que consiste na via de translocação destes metabólitos nas plantas. Mais especificamente, o floema é composto de tubos crivados (TC) e células companheiras (CC). Os TCs são células vivas que contêm mitocôndrias, plastídios e retículo endoplasmático liso; contudo eles perdem seu núcleo e tonoplasto durante o desenvolvimento. O TC e as CC são formados pela divisão de uma mesma célula inicial, sendo que na maturidade, essas células irmãs permanecem interligadas por plasmodesmatas (Hopkins 1999).

Existem três tipos de células companheiras: as comuns; as de transferência e as intermediárias. Os três tipos possuem núcleo, citoplasma denso e muitas mitocôndrias. As CCs comuns são conectadas às outras células por uma quantidade pequena de plasmodesmatas. As de transferência possuem invaginações do lado do TC para facilitar a troca de solutos, enquanto que as células intermediárias possuem numerosos plasmodesmatas. Enquanto a CC comum e de transferência devem estar associadas à recepção de solutos vindos do apoplasto, a presença de inúmeros plasmodesmatas nas células intermediárias sugere um envolvimento no aporte de solutos via simplasto.

*O carregamento no floema em tecidos fonte pode ser simplástico ou apoplástico*

O carregamento no floema em tecidos fonte envolve o movimento dos produtos dos cloroplastos nas células do mesófilo para as células do tubo crivado. Esse processo ocorre nas nervuras terminais das folhas. Analisando o processo de carregamento sob o ponto de vista anatômico e bioquímico, vemos que a triose fosfato produzida no estroma dos cloroplastos deve ir para o citoplasma e se converter em sacarose. A sacarose deve migrar das células do mesófilo para a vizinhança dos TC nas nervuras terminais das folhas e, finalmente, entrar no complexo CC-TC. Como citado anteriormente, existem dois tipos principais de carregamento: o apoplástico (mediado por transporte ativo) e o simplástico (através dos plasmodesmatas).

*Os transportadores de sacarose são fundamentais para o carregamento apoplástico*

Em plantas com carregamento apoplástico, a sacarose do apoplasto entra no complexo CC-TC através de um carregador localizado na membrana plasmática que faz simporte entre sacarose e prótons ( $H^+$ ). Para garantir o suprimento de prótons no apoplasto, é necessário a atividade de uma ATPase. A presença do transportador de sacarose é importante também para garantir um fluxo contínuo desse açúcar vindo do mesófilo para o apoplasto, pois ele mantém o potencial químico dessa substância sempre baixo no apoplasto. Posteriormente, pelo menos um transportador é necessário para que ocorra a captação de sacarose para o floema. Sua re-captção ao longo da via de translocação é necessária para que ocorra a troca de solutos com o floema, como por exemplo nos entrenós.

*O carregamento simplástico está relacionado com a formação de polímeros de sacarose*

No carregamento via simplasto, não há a necessidade de um transportador de sacarose para que esta atravesse a membrana plasmática. Contudo, o acúmulo de açúcares no complexo CC-TC impede que esse processo seja feito por simples difusão, pois com o passar do tempo o fluxo se reverteria. Uma hipótese para esse tipo de transporte seria o modelo de armadilha de polímero proposto por Turgeon, 1996. Nesse modelo, a sacarose move-se do mesófilo para a célula intermediária onde ela se converte em rafinose mantendo o gradiente de difusão.

*O descarregamento na região do dreno pode ser simplástico ou apoplástico.*

De todas as etapas do transporte no floema, o descarregamento é o que parece estar mais diretamente ligado com as diferenças na capacidade de armazenamento entre os diferentes tipos de drenos. Com a perspectiva de se aumentar o descarregamento em drenos de interesse econômico, tais como frutos, sementes, tubérculos e raízes tuberosas, esse processo vem sendo objeto de intensos estudos (Patrick 1997; Oparka e Cruz 2000). Assim como o carregamento do floema que ocorre na fonte, o descarregamento que ocorre nos drenos envolve uma série de etapas, tais como: 1. descarregamento do soluto vindo do TC; 2. transporte a curta distância depois do descarregamento até as células do dreno e 3. armazenamento e metabolismo do açúcar no dreno. As duas primeiras etapas constituem o descarregamento propriamente dito, o qual pode ser do tipo simplástico ou apoplástico. A terceira etapa (armazenamento e metabolismo do fotoassimilado) é denominada como alocação de assimilados.

*O tipo de descarregamento varia com a espécie e com o estágio de desenvolvimento*

A ocorrência de descarregamento simplástico ou apoplástico varia de acordo com a espécie vegetal, o tipo de tecido ou órgão e a fase de desenvolvimento. O tipo de descarregamento com maior capacidade de transporte é o simplástico e por isso o apoplástico é reservado para situações especiais. No entanto, alguns autores propõem esse tipo de descarregamento em cana-de-açúcar (Bowen e Hunter, 1972; citado por Zhu et al,

2000) cabendo ressaltar que essa rota ocorre somente em entrenós imaturos, uma vez que em entrenós maduros há uma suberização e lignificação, formando uma barreira apoplástica na parede celular das células da bainha do feixe vascular, não permitindo o contato entre as células do tubo crivado e as células parenquimáticas (Jacobsen et al, 1992; Patrick 1997; Rae et al, 2005).

*Tanto o descarregamento simplástico quanto o apoplástico são dependentes de ATP*

No descarregamento apoplástico pode haver necessidade de gasto de energia para que os assimilados atravessem membranas. Nesse tipo de descarregamento, o açúcar deve atravessar duas membranas: a do TC e a da célula receptora. Às vezes há necessidade de atravessar a membrana do tonoplasto também, se a sacarose for armazenada no vacúolo. Os transportadores de sacarose envolvidos no descarregamento são considerados como facilitadores ou próton-antiporters (Walker et al, 1995). A sacarose presente no apoplasto de tecidos drenos pode ser carregada diretamente ou na forma de hexoses, através de sua hidrólise pelas enzimas invertases. Embora não haja necessidade de atravessar membranas no descarregamento simplástico, há necessidade de energia para o metabolismo e biossíntese de polímeros de reserva.

### ***Transportadores de sacarose***

As proteínas transportadoras de açúcar possuem um papel crucial no transporte e distribuição destes fotoassimilados ao longo da planta e/ou célula à célula. Diversos genes que codificam transportadores de açúcar em plantas já foram identificados, expressos funcionalmente em sistemas heterólogos e tiveram seu padrão de expressão analisado (para uma revisão veja Williams et al, 2000; Buttner e Sauer, 2000).

Como dito anteriormente, as plantas possuem duas famílias distintas de transportadores de açúcar: os transportadores dissacarídeos (DSTs/SUTs), responsáveis pelo transporte da sacarose; e os transportadores monossacarídeos (MSTs), responsáveis pelo transporte de hexoses, que são produtos da hidrólise da sacarose pelas enzimas invertases.

### ***Transportadores de monossacarídeos (MST)***

Os MSTs já foram identificados em diversas espécies de plantas; em *A. thaliana* por

exemplo, essa família chega a ser composta por 26 genes. Esses transportadores fazem parte de uma família de proteínas integrais de membrana que possuem 12 hélices transmembrana e exibem alta similaridade entre os MSTs de leveduras, bactérias e mamíferos (Buttner e Sauer, 2000). Seu padrão de expressão sugere seu envolvimento de captação de hexoses nos tecidos drenos (Sauer e Stadler, 1993) podendo ser regulados em resposta a infecção por patógenos ou após fermentos (Truernit et al, 1996). Sua expressão nesses tecidos sugere um mecanismo apoplástico de descarregamento do floema (Sauer e Stadler 1993). Para tal, os tecidos dreno adquirem a hexose a partir da hidrólise de sacarose no meio externo pela invertase extracelular. Tal como citado anteriormente, espera-se uma maior expressão destes transportadores nos entrenós imaturos da cana, uma vez que existe uma barreira apoplástica nos entrenós maduros, impossibilitando o descarregamento apoplástico de sacarose.

#### *Transportadores de dissacarídeos (DST ou SUT)*

Os genes transportadores de sacarose (*DSTs* ou *SUTs*) codificam proteínas altamente hidrofóbicas, que consistem de 12 domínios transmembranas, um grande *loop* central hidrofílico e são distantemente relacionados da família de transportadores de hexose encontrada em diversos organismos, tais como levedura e plantas (revisado por Ward et al, 1998).

O carregamento de sacarose em diversas espécies de plantas é caracterizado pela presença de pelo menos dois componentes que apresentam propriedades cinéticas bem distintas. Entre eles estão incluídos os sistemas de transporte de alta e baixa afinidade. Análises filogenéticas demonstraram que os transportadores de sacarose fazem parte de 3 grandes grupos, denominados SUT1, SUT2 e SUT4.

Durante esta última década, genes que codificam proteínas SUT tem sido isolados em diversas espécies de plantas mono e dicotiledôneas. Para muitas destas espécies, dois ou mais genes *SUT* foram publicados (para revisão veja Williams et al, 2000). Em *A.thaliana* por exemplo, cinco genes *SUT* foram funcionalmente caracterizados por expressão heteróloga em levedura (Sauer and Stolz 1994; Meyer et al, 2000; Schulze et al, 2000; Weise et al, 2000; Ludwig et al, 2000). Em batata e tomate foram identificados três genes *SUT*, com diferentes características para transporte de açúcar (Riesmeier et al, 1993; Barker et al, 2000; Hackel et al, 2006).

O primeiro gene *SUT* identificado em monocotiledôneas foi em arroz, denominado *OsSUT1* (Hirose et al, 1997). Sua capacidade em transportar sacarose foi demonstrada utilizando expressão heteróloga em levedura. Após sua identificação e caracterização, outros genes ortólogos ao *SUT1* foram identificados em monocotiledôneas, tais como em milho (*ZmSUT1* - Aoki et al, 1999), cevada (*HvSUT1* - Weschke et al, 2000), trigo (*TaSUT1* - Aoki et al, 2002) e recentemente em cana-de-açúcar (*ShSUT1* - Rae et al, 2005).

Recentemente Aoki et al, (2003) identificaram 5 possíveis genes transportadores de sacarose no genoma de arroz: *OsSUT1* a *OsSUT5*. É interessante observar que as seqüências de aminoácidos deduzidas de *OsSUT1*, *OsSUT3*, *OsSUT4* e *OsSUT5* agrupam-se juntamente com os transportadores de dicotiledôneas *SUT2/SUC3*, tais como *AtSUC3* e *PmSUC3*, denominados como a subfamília Tipo II. *OsSUT2*, juntamente com *HvSUT2*, foram relacionadas ao grupo *SUT4* de dicotiledôneas, denominado como subfamília Tipo III. Entretanto, estes dois clusters estão separados filogeneticamente daquele que possui a maior parte dos transportadores de sacarose de dicotiledôneas, tais como *AtSUC1*, *PmSUC2*, *AtSUT4* e *LeSUT1*, denominados como a subfamília Tipo I.

#### *Tecido-especificidade dos transportadores de sacarose*

A maioria das plantas converte o  $\text{CO}_2$  fotossinteticamente fixado em sacarose que será a principal forma de carboidrato transportado pelo floema. Certos tecidos drenos, tais como folhas jovens ou raízes, possuem acesso direto ao floema via plasmodesmatas. Outros tecidos, tais como grãos de pólen ou embriões em desenvolvimento, são simplasticamente isolados e importam os fotoassimilados somente com a ajuda de proteínas transportadoras. Os MSTs, responsáveis pelo transporte de hexoses clivadas a partir da sacarose extracelular, já tiveram sua expressão identificadas nesses tecidos dreno. Porém a expressão desses transportadores monossacarídeos também foi relatada em folhas verdes, consideradas tecidos fonte e que certamente não dependem de carboidratos importados de outros tecidos. Esses transportadores podem estar participando na recuperação de hexoses, geralmente perdidas das células para o apoplasto por meio de um vazamento passivo na membrana plasmática (Buttner e Sauer 2000).

Por outro lado, os DSTs são expressos tanto nos tecidos fonte quanto nos drenos. Em algumas plantas foi observada a expressão desses transportadores nos elementos do tubo crivado (Kuhn et al, 1997) e também nas células companheiras (Stadler et al, 1995) ;

(Stadler e Sauer 1996); no floema, ao longo da via de translocação, podendo estar envolvidos com o descarregamento da sacarose nos tecidos drenos, tais como nas raízes (Riesmeier et al, 1993; Truernit e Sauer 1995); em sementes em desenvolvimento (Bick et al, 1998) e órgãos florais (Stadler et al, 1999); dentre outros revisados por Williams *et al*, 2000. Em cana-de-açúcar, por exemplo, foi observado níveis de transcrito do gene *ShSUT1* em regiões da planta que possui um alto fluxo de sacarose, tais como folhas maduras (tecidos fonte) e também em entrenós intermediários (5 e 6) (Rae et al, 2005).

#### *Transportadores de açúcar em cana*

Devido a sua capacidade única em estocar sacarose nos entrenós, a cana-de-açúcar torna-se uma importante fonte de informação a respeito dos mecanismos envolvidos na síntese, transporte e acúmulo de sacarose. Vias metabólicas e enzimas associadas à síntese e clivagem de sacarose tem sido extensivamente estudadas; entretanto, as proteínas que facilitam o movimento de sacarose entre as membranas tornaram-se foco de atenção recentemente, sendo que até agora apenas dois transportadores foram identificados em cana-de-açúcar (Casu et al, 2003; Rae et al, 2005). Esses dois autores identificaram essas proteínas a partir de bibliotecas de cDNA de entrenós maduros e imaturos de cana. O primeiro transportador de açúcar identificado em cana foi nomeado como PST tipo 2a e análises *in situ* demonstraram que o acúmulo de seus transcritos eram localizados nas células companheiras do floema e parênquima associado em entrenós maduros, sugerindo seu envolvimento na translocação e não na estocagem de açúcar (Casu et al, 2003). O segundo transportador identificado em cana foi nomeado como *ShSUT1* e possui homologia com a família SUT/SUC de transportadores de açúcar de plantas. *ShSUT1* foi expresso predominantemente em folhas maduras, que são consideradas exportadoras de açúcar, e em entrenós que acumulam sacarose. Análises por imunolocalização identificaram essas proteínas nas células periféricas do feixe vascular dos entrenós. Os autores sugerem que esse gene possui um importante papel no particionamento da sacarose entre os tecidos de transporte e estoque (Rae et al, 2005).

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material vegetal*

As plantas utilizadas neste projeto pertencem a uma progênie F1 de indivíduos de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) provenientes de um cruzamento controlado entre as variedades SP 80-180, que foi utilizada como genitor feminino, e a SP 80-4966, como genitor masculino. Esse material vegetal foi fornecido e coletado no CTC, em Piracicaba (SP).

Foram coletadas amostras de 4 tecidos: colmos em três estádios de maturação (entrenós 1, 3 e 5; numeração padronizada ao longo da elongação do colmo, do mais jovem até o mais velho, de acordo com (Van Dillewijn C. 1952) também folha +1, após 6, 7, 9, 11, e 13 meses pós-plantio (fevereiro, março, maio, julho e setembro/2002, respectivamente). Esse material foi coletado de 7 indivíduos de cada extremo da população segregante para teor de sacarose de cana-de-açúcar. Foi também calculado o teor de *brix* (quantidade de sólidos solúveis) com um refratômetro para cada indivíduo ao longo das coletas. As partes idênticas dos tecidos de cada *bulk* foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### *Extração de RNA*

O RNA total foi extraído com Trizol (Life Technologies, EUA), conforme as modificações para tecidos ricos em polissacarídeos, recomendado pelo fabricante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (GeneQuant, AP-Biotech, SP-Brasil), confirmado em gel de agarose com formaldeído e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### *Busca por transportadores de açúcar em cana-de-açúcar*

A seleção de SAS foi feita a partir de duas estratégias que envolveram a equipe de bioinformática. Para a primeira foi feito um banco com os dados de entrada PF0083 do Pfam, cujo nome é Sugar-Tr e consiste num banco de proteínas que possuem o domínio de “Sugar (and other) transporters”. Para a segunda estratégia foram montados dois bancos de dados com proteínas descritas em literatura para DSTs e MSTs. Foi então realizado um BlastX dos SASs presentes no SUCEST contra todas essas seqüências presentes nos nossos bancos. Para tal foram selecionados os SASs que apresentaram maior similaridade com essas seqüências, considerando o e-value máximo de  $10^{-5}$ . Cada clone teve seu DNA plasmidial isolado e digerido com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI (AP-Biotech,

SP-Brasil), para posterior análise de expressão.

#### *RNA blot*

O RNA total extraído foi quantificado em espectrofotômetro (GeneQuant, AP Biotech, Brasil), sendo que 10 µg foram aplicados em gel de agarose com formaldeído e transferido para membrana de *nylon* (Hybond N, AP Biotech, Brasil). A marcação da sonda correspondente aos genes selecionados foi realizada empregando o kit *Ready To Go* segundo as especificações do fabricante (AP Biotech, Brasil). As membranas foram pré-hibridizadas e hibridizadas de acordo com Sambrook (1989). Após a hibridização as membranas foram lavadas (Sambrook 1989), seladas e expostas por 24 h em cassetes apropriados do PhosphorImager (FLA3000, Fujifilm, Japão). Após captação da imagem a sonda foi retirada por incubação em solução de SDS 0,1% fervendo por 5 min. Após a exposição das membranas por 24 h, as imagens geradas foram captadas e analisadas por programas específicos (ImageQuant - Fujifilm – Japão).

#### *Hibridizações in situ*

As ribossondas foram preparadas a partir dos plasmídeos linearizados utilizando T7 e SP6 RNA polimerases (AP Biotech, Brasil) e digoxigenina (DIG)-11-rUTP (Boehringer, Alemanha), como descrito pelos fabricantes. Os tecidos de entrenós foram fixados em glutaraldeído-PIPES overnight a 4°C, desidratados em séries de etanol e butanol e então embebidos em Paraplast Plus (Sherwood Medical, EUA). Os cortes foram feitos em micrótomo (15µm), acondicionados em lâminas *ProbeOn Plus* (Fischer Scientific, EUA), desparafinizados em xileno, reidratado e tratado com Proteinase K (1µg/mL). Os cortes foram então tratados com 0.1% de anidrido acético em 100mM de triethanolamine por 10 min e incubados overnight a 55°C em tampão de hibridização (50% formamida deionizada, 5x SSC, 5% SDS, 100 µg/ml tRNA e 100 µg/ml polyA) contendo as respectivas sondas (5µg/mL). Os cortes foram então lavados duas vezes em 0.2xSSC, 0.2% SDS a 55°C por 10 min, seguido de RNase A 10µg/mL por 20 min. Para a detecção imunológica os cortes foram incubados no reagente de bloqueio 0.5% por 1 hora e depois em anti-DIG-alkaline phosphatase conjugate (1:1000) diluída em 0.5% de BSA, 1 hora em temperatura ambiente. A reação colorimétrica foi feita com 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> com 338 µg/ml NBT, 175 µg/ml BCIP, 1 mM Levamisole, overnight a temperatura

ambiente em uma câmara escura. Os cortes foram então reidratados em séries de etanol e montados com Permount (Fischer Scientific, EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os tecidos dreno recebem a quantidade necessária de açúcar para seu crescimento e desenvolvimento, sendo que toda essa regulação é mediada via transportadores de açúcar. Esses tecidos podem tanto importar sacarose do apoplasto diretamente via transportadores de dissacarídeos (DST/SUT) quanto via transportadores de monossacarídeos (MST), quando a sacarose encontra-se hidrolisada em glicose e frutose via invertases (Williams et al, 2000; Truernit 2001). Recentemente foram identificados dois transportadores em cana-de-açúcar, um pertencente à família MST (Casu et al, 2003) e outro à família DST (*ShSUT1*, Rae et al, 2005). Porém, ainda não foram identificados todos os transportadores de açúcar em cana, e tal como feito em arroz (Aoki et al, 2003), houve a necessidade de se fazer uma procura mais apurada por esses transportadores no banco de dados do SUCEST.

### *Identificação dos transportadores de açúcar em cana-de-açúcar*

Foram utilizadas duas estratégias para uma completa identificação dos transportadores de açúcar presentes em cana. A primeira baseou-se no banco de domínios do Pfam e permitiu identificar 80 SASs de cana que continham o domínio Sugar-Tr. A segunda, que baseou-se em dados de literatura, nos permitiu identificar 73 SASs classificados como MST e 54 classificados como DST. Porém, vale ressaltar que esses números devem ser avaliados com cuidado, uma vez que nem todas as seqüências que possuem o domínio Sugar-Tr são obrigatoriamente transportadores de açúcar. Encontramos nessa análise muitos outros tipos de transportadores, tais como de potássio, que também possuíam esse domínio, e foram posteriormente descartados. Para a segunda análise também nos deparamos com esse tipo de problema. Muitos classificados como MST também estavam presentes no grupo DST e vice-versa. E a terceira consideração é que muitos desses SASs não possuíam sua seqüência completa, ou seja, não possuíam as regiões carboxi e/ou amino terminal completas.

Dessa maneira, após ter retirado todas as redundâncias, os resultados do nosso *datamining* sugerem a existência de 13 prováveis transportadores de açúcar, completos, sendo 9 transportadores de monossacarídeos e 4 de dissacarídeos (Tabela 1).

## A família MST de cana-de-açúcar

### *Classificação dos membros da família MST de cana-de-açúcar*

Análises filogenéticas sugerem a existência de 9 transportadores de monossacarídeos em cana-de-açúcar (figura 1), sendo 5 participantes da Classe I (STP), 1 pertencente à Classe II (*Sugar Alcohol Transporters*), 2 à Classe III (MSSP) e 1 presente na Classe VI (GlcT).

O maior número de MSTs identificados em cana pertence a Classe I de Transportadores de Monossacarídeos (STP – figura 1), de acordo com Lalonde et al, (2004). Foram identificados 5 MSTs pertencentes à essa classe em cana (*SsMST1*, *SsMST2*, *SsMST3*, *SsMST4* e *SsMST6*, *Saccharum sp monossacharide transporter*), sendo que essa numeração seguiu seu respectivo ortólogo já descrito em arroz (Aoki et al, 2003). Essa classe é a melhor caracterizada em plantas, sendo que nela estão presentes tanto transportadores de mono quanto de dicotiledôneas. Em *Arabidopsis* já foram identificadas 14 proteínas pertencentes a essa classe e 13 em arroz (Toyofuku et al, 2000).

*SsPST1* (*Saccharum sp putative sugar transporter*) faz parte da Classe II de Transportadores de Monossacarídeos (figura 1), de acordo com Lalonde et al, (2004). Essa classe está representada por proteínas transportadoras de polióis, moléculas de açúcar estruturalmente similares a monossacarídeos. O gene *SsPST1* possui uma alta similaridade com um fragmento de cDNA de cana-de-açúcar (PST3) depositado no NCBI por Casu et al, (2003). Porém ele também possui similaridade com um transportador de poliól de *Plantago major* identificado por Ramsperger-Gleixner et al, (2004). Polióis, tais como sorbitol e manitol, são encontrados em altas concentrações no floema de diversas famílias de plantas, tais como Rosaceae e Apiaceae, sendo que recentemente, seis genes de *Arabidopsis* foram encontrados como ortólogos à essa família de transportadores (Klepek et al, 2005). Esses açúcares são sintetizados nas folhas e translocados para o floema por poliól-H<sup>+</sup> simporters. A análise de expressão transiente de um dos seis genes identificados em *Arabidopsis* (*AtPLT5*) demonstrou sua localização na membrana plasmática e sua análise funcional revelou que essa proteína é capaz de transportar diversos polióis, tais como sorbitol, xilitol, glicerol e também diferentes hexoses e pentoses, tais como rafinose. Esse açúcar em questão não havia sido relatado em nenhuma outra planta (Klepek et al, 2005).

*SsPST2* e *SsPST3* (Saccharum sp putative sugar transporter) estão presentes em um mesmo grupo filogenético (figura 1), pertencente à Classe III de Transportadores de Monossacarídeos (Lalonde et al, 2004). A principal característica das proteínas desse grupo é a presença de um grande loop central. A presença desse domínio pode indicar que essas proteínas são sensores de açúcar ligadas à membrana, similares a SNF3 e RGT2 de levedura (Ozcan et al, 1996, 1998), daí a nomenclatura dada à essa classe MSSP – *Monosaccharide sensing proteins*. *SsPST2* apresentou similaridade com outro fragmento de cDNA depositado por Casu et al, (2003) (PST2) e o gene *SsPST3* possui similaridade com um transportador de hexose de *Hordeum vulgare* (cevada) identificado por Weschke et al, (2003). Como ainda é incerto o substrato a ser transportado por essas três proteínas, nós achamos conveniente que elas fossem designadas como PSTs de *Putative Sugar Transporters*.

*SsGlcT* (Saccharum sp glucose transporter) pertence a uma família de translocador de glicose, localizado na membrana do cloroplasto (Weber et al, 2000). Durante a fotossíntese, parte do carbono fixado é direcionado para a síntese transitória de amido, que será útil como estoque intermediário de carbono nos cloroplastos. Esse amido, quando quebrado pela enzima amilase, resulta na formação de glicose que será então transportada para fora do cloroplasto através de um translocador de glicose (Weber et al, 2000). Esse amido transitório é mobilizado para suprir a contínua necessidade de carbono (isto é, sacarose) para ser exportada para os tecidos drenos assim como para o metabolismo energético da própria folha. Este translocador foi primeiramente identificado em espinafre e sua seqüência utilizada para a clonagem em batata, tabaco, milho e *Arabidopsis* (Weber et al, 2000). É interessante notar que, apesar de também transportar um monossacarídeo, esse gene possui uma fraca similaridade com essa família, formando dois grupos independentes. *SsGlcT* possui uma alta similaridade com seu ortólogo em milho (figura 1).

É importante ressaltar que, apesar das análises filogenéticas correlacionarem esses transportadores a seus substratos transportados, apenas uma análise funcional poderá nos afirmar qual tipo de açúcar eles transportam e com qual afinidade esse transporte está ocorrendo.

### *Expressão espacial dos genes MSTs de cana-de-açúcar*

Para avaliar a tecido-especificidade destes prováveis transportadores em cana-de-açúcar, foram construídas membranas contendo amostras de RNA de tecidos considerados fontes (folha +1) e drenos (palmito–folha jovem, entrenó 1, raiz, gema lateral e flores). Essas amostras são provenientes de um dos cultivares de cana-de-açúcar utilizados para a confecção das bibliotecas de cDNA do projeto SUCEST (SP80-3280). Cada membrana foi hibridada contra os 13 longests clones identificados na tabela 1.

Os MSTs, responsáveis pelo transporte de hexoses clivadas a partir da sacarose extracelular, já tiveram sua expressão identificadas em tecidos dreno, sugerindo um importante papel no suprimento de carboidratos nesses tecidos e também em tecidos em intenso desenvolvimento, tais como os florais (para uma revisão, veja Buttner and Sauer 2000). Esse padrão de expressão foi verificado para os transcritos dos genes *SsMST1* e *SsMST2* (figura 3). O primeiro possui uma expressão acentuada nas folhas imaturas (palmito) e também nas gemas laterais, enquanto que o último possui uma expressão restrita às raízes, todos eles considerados fortes tecidos dreno. Porém a expressão destes transportadores monossacarídeos também foi relatada em folhas verdes, consideradas tecidos fonte e que certamente não dependem de carboidratos importados de outros tecidos (Bush, 1996; Tubbe et al, 1992; Williams et al, 2000) tal como observado no padrão de expressão dos genes *SsMST3* e *SsMST4* (figura 3). Ambos os genes possuem forte expressão em folhas maduras e raízes, sendo que *SsMST3* possui um maior nível de transcritos em folhas e *SsMST4* em raízes. Pode-se assumir que este tipo de transportador também participa da recuperação de monossacarídeos que se perderam das células para o apoplasto por meio de um vazamento passivo na membrana plasmática (Buttner e Sauer, 2000).

Foi observado que os três transcritos de *SsPSTs* analisados apresentaram fortes níveis de expressão nos RNA blots analisados. Tal como discutido anteriormente, esses prováveis transportadores de açúcar possuem uma alta homologia com a família dos MSTs, que são responsáveis pelo transporte de hexoses clivadas a partir da sacarose extracelular. Transcritos de *SsPST1* foram encontrados tanto em tecidos fonte (folha madura) quanto dreno, apresentando maiores níveis em entrenós imaturos (figura 3). Esse padrão de expressão também foi observado para transcritos de *AtPLT5* de *Arabidopsis* (Klepek et al,

2005) que pertence ao mesmo grupo de transportadores de poliol. Transcritos de *SsPST2* e *SsPST3* apresentaram fortes níveis de expressão em tecidos drenos, tais como raiz e flores (*SsPST2* - figura 3), e entrenó imaturo e flores (*SsPST3* – figura 3). Esse perfil de expressão sugere um importante papel desses transportadores no suprimento de carboidratos nesses tecidos fotossinteticamente inativos.

Foram encontrados transcritos do translocador de glicose (*SsGlcT*) em todos os tecidos analisados, com um leve aumento em flores. Em espinafre foi observado uma forte expressão nas folhas de transição fonte/dreno, seguido por folhas maduras e botões florais (Weber et al, 2000).

#### *O possível envolvimento de membros da família MST no acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar*

Para esta análise foram construídas membranas contendo RNA provenientes de bulks segregantes para teor de açúcar, em dois pontos de coleta – 7 e 11 meses pós plantio. Optou-se por escolher esses dois pontos devido a diferença de teor de brix encontrado entre os indivíduos. Para cada bulk foram utilizadas amostras de entrenó 1 (imaturo), entrenó 5 (intermediário) e entrenó 9 (maduro). Desta maneira, acreditamos poder relacionar a expressão e o possível envolvimento destes transportadores com a quantidade de sacarose presente em cada bulk, ao longo da maturação e também ao longo da planta.

Observa-se um padrão de expressão similar entre os quatro MSTs analisados (Figura 3). Eles possuem uma expressão relativamente fraca e ao mesmo tempo restrita aos entrenós imaturos e/ou intermediários. Tal como citado anteriormente, alguns autores sugerem um descarregamento apoplástico em entrenós imaturos de cana-de-açúcar e um descarregamento simplástico em entrenós maduros, devido à formação de uma barreira apoplástica (Jacobsen et al, 1992; Patrick 1997; Rae et al, 2005). Nossos dados corroboram com essa afirmação, uma vez que não foi observada expressão desses transportadores nos entrenós mais maduros (9). Com exceção do transportador *SsMST1*, todos os outros três são expressos somente em 7 meses pós plantio (MAPs), não havendo expressão desses genes em 11 MAPs. E finalmente, indo contra todas as nossas expectativas, para todos eles não se observa diferenças de expressão significativas entre os indivíduos de alto e baixo teor de sacarose (Figura 4). Somente para os genes *SsPST2* e *SsPST3* observou-se uma diferença

sutil nos níveis de transcritos entre indivíduos de alto e baixo teor de sacarose. Podemos concluir que, em níveis normais, a expressão destes transportadores não é responsável pela diferença de teor de açúcar encontrada entre esses indivíduos.

Para o translocador de glicose (*SsGlcT*), observa-se uma forte expressão nos entrenós imaturos em 7 MAPs, e uma sutil regulação ao longo da maturação da planta em 11 MAPs (Figura 3). Assim como para os MSTs, não foi observada diferenças entre indivíduos de alto e baixo teor de sacarose (Figura 4).

#### *Localização de transcritos de membros da família MST em entrenós imaturos de cana-de-açúcar*

O padrão de expressão celular do transportador *SsMST1* foi examinado com maior detalhe em entrenós imaturos de indivíduos de baixo teor de sacarose por hibridação *in situ*. Apesar de termos iniciado nossa técnica utilizando lâminas contendo amostras de folha e entrenós 1, 5 e 9 de indivíduos de alto e baixo teor de sacarose, apenas as lâminas contendo entrenó 1 de indivíduos de baixo teor apresentaram resultado positivo. Para todas as outras lâminas o que observou-se foi um descolamento do material após a adição da Proteinase K. Fizemos algumas modificações sugeridas pelo prof. Dr. Marcelo C. Dornelas (Depto Fisiologia Vegetal – UNICAMP), mas mesmo assim os tecidos continuaram descolando das lâminas, impossibilitando sua análise.

Observa-se na figura 4A um corte hibridizado com a sonda *SsMST1* antisense, cuja maior parte dos transcritos encontra-se nas células do parênquima vascular. Em D temos um corte similar, hibridizado com a sonda *SsMST1* sense, onde não há sinal de hibridização. Sabe-se que a sacarose é descarregada do floema para o apoplasto. Nesse espaço há a presença de invertases extracelulares, que são as enzimas responsáveis pela quebra da sacarose em hexoses que serão transportadas por um transportador de monossacarídeo. Por apresentar uma maior expressão em tecidos dreno (palmito, gema lateral e flor – Figura 3) e ser localizado somente nas células do parênquima vascular, pode-se inferir que esse gene *SsMST1* esteja provavelmente envolvido no descarregamento de hexoses nas células de estocagem.

Observa-se na figura 4B um corte hibridizado com a sonda *SsPST3* antisense, sendo que a maior parte dos transcritos encontra-se nas células companheiras e também nas

células do parênquima proximal do floema e protoxilema. Esse padrão de expressão também foi observado para os transcritos de PST *type 2a* identificado em cana-de-açúcar (Casu et al, 2003) e pertencente a mesma classe de transportadores (Classe III – Transportadores MSSP) no qual encontra-se *SsPST3*. O fato desses transcritos estarem presentes nessas células sugere sua participação na translocação de hexoses para os tecidos drenos.

Na figura 4C observa-se um corte de entrenó imaturo hibridizado com a sonda *SsGlcT* antisense. Observa-se a presença de seus transcritos nas células do elemento do tubo crivado e células companheiras, além de estar presente também nas células do parênquima proximal do protoxilema. Tal como apresentado anteriormente, *SsGlcT* pertence a uma família de translocador de glicose, localizado na membrana do cloroplasto (Weber et al, 2000). Esse transportador pode estar participando na translocação de glicose gerada pela quebra do amido de reserva nos entrenós, uma vez que esse tecido não é fotossinteticamente ativo. Ensaios com iodeto de potássio (Lugol) demonstraram a presença de grãos de amido nesse tecido dreno (figura 6), corroborando nossa hipótese.

## **A família SUT de cana-de-açúcar**

### *Classificação dos membros da família SUT de cana-de-açúcar*

Análises filogenéticas demonstraram que os transportadores de sacarose descritos em literatura fazem parte de 3 grandes grupos (figura 2). Dos 4 *SsSUTs* (*Saccharum* sp *sucrose transporter*) identificados em cana, nenhum faz parte da subfamília I (SUT1/SUC2), que é formada apenas por transportadores de sacarose de alta afinidade de dicotiledôneas. Os genes *SsSUT1*, *SsSUT3* e *SsSUT4* pertencem à subfamília II (SUT4), que também é formada por transportadores de sacarose de alta afinidade, sendo que *SsSUT1* e *SsSUT4* participam de um grupo onde se encontram apenas transportadores de monocotiledôneas. Há a hipótese de que membros dessa subfamília são responsáveis pelo carregamento de sacarose pelo floema e seu consequente descarregamento nos tecidos fotossinteticamente inativos (Lalonde et al, 2004).

O gene *SsSUT2* pertence à subfamília III onde se encontram os transportadores de sacarose de baixa afinidade. Membros dessa subfamília possuem um grande loop central,

altamente conservado em mono e dicotiledôneas, sugerindo uma função específica para esse domínio. Assim como para membros da Classe III de MSTs (MSSP-like transporters) a subfamília SUT2 pode ser denominada como sensores de açúcar.

#### *Expressão dos genes SUTs de cana-de-açúcar*

Os DSTs também são expressos tanto nos tecidos fonte quanto nos drenos. Em algumas plantas foi observada a expressão destes transportadores nos elementos do tubo crivado (Kuhn et al, 1997) e também nas células companheiras (Stadler e Sauer 1996); no floema, ao longo da via de translocação, podendo estar envolvidos com o descarregamento da sacarose nos tecidos drenos, tais como nas raízes (Riesmeier et al, 1993; Truernit and Sauer 1995); em sementes em desenvolvimento (Bick et al, 1998) e órgãos florais (Stadler et al, 1999); dentre outros revisados por Williams et al, (2000).

Foi observada a presença de transcritos do gene *SsSUT1* tanto em tecidos fonte (folha madura) quanto dreno (flores), podendo estar envolvido tanto no descarregamento como no carregamento de sacarose (Figura 3). A forte expressão em folhas maduras condiz com o observado para seu homólogo descrito por Rae et al, (2005), porém eles não analisaram sua expressão em tecidos florais. A forte expressão de *SsSUT1* em regiões com alto fluxo de sacarose (folhas maduras que exportam sacarose, entrenós intermediários e flores) sugere que esse transportador possui um importante papel no particionamento da sacarose entre os tecidos de transporte e de estocagem. A imunolocalização desse gene em cana-de-açúcar demonstrou sua presença nas células que circundam o feixe vascular tanto de folhas quanto de entrenós, incluindo as células do parênquima e do esclerênquima (Rae et al, 2005).

O padrão de expressão dos genes *SsSUT2* e *SsSUT3*, mais ativos em palmitos, entrenó 1 e gema lateral (Figura 3) é similar ao dos genes que codificam prováveis proteínas DSTs de arroz (*OsSUT3*, 4 e 5), mais expressos em folhas dreno. A expressão em tecidos dreno sugere o envolvimento desses transportadores no suprimento de sacarose, assim como na sua translocação em tecidos em desenvolvimento ou também no suprimento temporário de sacarose em tecidos de reserva. Porém, assim como em soja, acredita-se que o descarregamento de sacarose em folhas jovens de arroz ocorra simplásticamente (Aoki et al, 2003). Como esse tipo de transporte ocorre via plasmodesmatas, não haveria

necessidade da presença de transportadores de açúcar nestes tecidos. Nossos resultados sugerem que há um transporte simplástico em tecidos drenos de cana-de-açúcar, mediado por proteínas transportadoras. Porém, é importante ressaltar que o papel do transporte de sacarose transmembrana ainda não foi completamente elucidado em tecidos drenos, principalmente em cana-de-açúcar, ficando em aberto uma discussão sobre seu real papel nestes órgãos.

*O possível envolvimento de membros da família SUT no acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar*

Dentre os três SUTs analisados, dois deles possuem um padrão de expressão muito similar entre si. Tanto *SsSUT2* quanto *SsSUT3* possuem uma fraca expressão restrita ao entrenó 1 (imaturo) em 7 MAPs. Mais uma vez, esse padrão de expressão pode estar relacionado à existência da barreira apoplástica existente nos entrenós maduros. O mesmo não se observa para o transportador *SsSUT1*, cuja expressão é forte e presente em todos os entrenós analisados ao longo da maturação. Observa-se uma maior expressão no entrenó 5 (intermediário) assim como observado para o mesmo gene, em cana-de-açúcar, por Rae e colaboradores (2005). Assim como para os MSTs, não foi observada diferenças de expressão significativas entre os indivíduos de alto e baixo teor de sacarose (Figura 4).

São muitas as evidências de regulação transcricional da expressão gênica de MSTs e DSTs. Há relatos na mudança nos níveis transcricionais desses transportadores em folhas em maturação (Truernit e Sauer, 1995; Riesmeier et al,1993), durante o desenvolvimento de sementes (Weber et al, 1997) ou durante a maturação do pólen (Ylstra et al, 1998). Também já foi relatado que fatores bióticos e abióticos afetam a expressão de alguns transportadores de açúcar (Truernit et al, 1996; Delrot et al, 2000; Noiraud et al, 2000). Também é importante ressaltar que esses transportadores não são regulados somente em níveis transcricionais, mecanismos de controle pós-transcricionais e pós-traducionais também foram descritos para transportadores de açúcar. Como exemplo temos a regulação diurna de DSTs (Kühn et al, 1997; Hirose et al,1997) e modificações na atividade de transportadores por fosforilações-desfosforilações (Roblin et al, 1998). Dessa maneira, análises de níveis de transcritos nos fornece apenas uma visão inicial de como esses transportadores se comportam em uma população segregante para teor de açúcar. Era

esperado que mudanças nos níveis de açúcar estariam afetando a expressão dos transportadores, mediante uma provável via metabólica sinalizada por açúcar (Chiou e Bush, 1998). Futuras análises mais detalhadas serão realizadas para determinar o real papel dessas proteínas frente ao acúmulo de açúcar em cana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aoki N, Hirose T, Scofield G.N, Whitfeld P.R, Furbank R.T. 2003. The sucrose transporter gene family in rice. *Plant and Cell Physiology* 44: 223-232.

Aoki N, Hirose T, Takahashi S, Ono K, Ishimaru K, Ohsugi R. 1999. Molecular cloning and expression analysis of a gene for a sucrose transporter maize (*Zea mays* L.). *Plant and Cell Physiology* 40: 1072-1078.

Aoki N, Whitfield P, Hoeren F, Scofield G, Newell K, Patrick J, Offler C, Clarke B, Rahman S, Furbank R.T. 2002. Three sucrose transporter genes are expressed in the developing grain of hexaploid wheat. *Plant Molecular Biology* 50: 453-462.

Barker L, Kuhn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward J.M, Frommer W.B. 2000. SUT2 a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12:1153-1164.

Bick JA, Neelam A, Smith E, Nelson SJ, Hall JL, Williams LE. 1998. Expression analysis of a sucrose carrier in the germinating seedling of *Ricinus communis*. *Plant Molecular Biology* 38: 425-435.

Bowen JE, Hunter JE. 1972. Sugar Transport in Immature Internodal Tissue of Sugarcane. *Plant Physiol.* 49: 789-793.

Bush DR, Chiou TJ, Chen LS. 1996. Molecular analysis of plant sugar and amino acid transporters *Jou Exp Botany* 47: 1205-1210.

Buttner M, Sauer N. 2000. Monosaccharide transporters in plants: structure function and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1465: 263-274.

Casu RE, Grof CPL, Rae AL, McIntyre CL, Dimmock CM, Manners JM. 2003. Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. *Plant Molecular Biology* 52: 371-386.

Chiou TJ, Bush DR. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:4784-4788

Delrot S, Atanassova R, Maurousset L. 2000. Regulation of sugar amino acid and peptide plant membrane transporters. *Bioc Biop Acta Biom* 1465: 281-306.

Hackel A, Schauer N, Carrari F. 2006. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2

inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Plant Journal* 45: 180-192.

Hirose T, Imaizumi N, Scofield G.N, Furbank R.T, Ohsugi R. 1997. cDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* 38: 1389-1396.

Hopkins WG. 1999. Introduction to plant physiology. Second edition. New York EUA.

Jacobsen KR, Fisher DG, Maretzki A, Moore PH. 1992. Developmental changes in the anatomy of the sugarcane stem in relation to phloem unloading and sucrose storage. *Botanica Acta* 105: 70-80.

Klepek YS, Geiger D, Stadler R. 2005. Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5 a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily mediates H<sup>+</sup>-symport of numerous substrates including myo-inositol glycerol and ribose. *Plant Cell* 17: 204-218.

Kuhn C, Franceschi V.R, Schulz A, Lemoine R, Frommer W.B. 1997. Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* 275: 1298-1300.

Lalonde S, Wipf D, Frommer WB. 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Ann Rev Pl Biol* 55: 341-372.

Ludwig A, Stolz J, Sauer N. 2000. Plant sucrose-H<sup>+</sup> symporters mediate the transport of vitamin H. *Plant Journal* 24: 503-509.

Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hummer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N. 2000. AtSUC3 a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant Journal* 24: 869-882.

Noiraud N, Delrot S, Lemoine R. 2000. The sucrose transporter of celery: Identification and expression during salt stress. *Plant Physiol.* 122:1447-14

Oparka KJ, Cruz SS. 2000. The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. *Ann Rev Pl Physiol and Pl Mol Biol* 51: 323-347.

Özcan S, Dover J, Rosenwald AG, Wölfl S, Johnston M. 1996. Two glucose transporters in *S.cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93:12428-12432

Özcan S, Dover J, Johnston M. 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO. J.* 17:2566-2573.

Patrick JW. 1997. Phloem unloading: Sieve element unloading and post-sieve element transport. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 191-222.

Rae AL, Perroux JM, Grof CPL. 2005. Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem: a potential role for the ShSUT1 sucrose transporter. *Planta* 220:817-25.

Ramsperger-Gleixner M, Geiger D, Hedrich R, Sauer N. 2004. Differential expression of sucrose transporter and polyol transporter genes during maturation of common plantain companion cells. *Plant Physiology* 134: 147-160.

Reymond P, Farmer EE. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 404-411.

Riesmeier JW, Hirner B, Frommer WB. 1993. Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *Plant Cell* 5: 1591-1598.

Roblin G, Sakr S, Bonmort J, Delrot S. 1998. Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. *FEBS Lett.* 424:165-168

Rolland F, Moore B, Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14: S185-S205.

Sauer N, Stadler R. 1993. A sink-specific H<sup>+</sup>/monosaccharide cotransporter from nicotiana tabacum – cloning and heterologous expression in bakers yeast. *Plant Journal* 4: 601-610.

Sauer N, Stolz J. 1994. SUC1 and SUC2 - 2 sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana* – expression and characterization in bakers yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant Journal* 6: 67-77.

Schulze W, Weise A, Frommer WB, Ward JM. 2000. Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. *FEBS Letters* 485:189-194.

Stadler R, Brandner J, Schulz A, Gahrtz M, Sauer N. 1995. Phloem loading by the PmSUC2 sucrose carrier from *Palntago Major* occurs into companion cells. *Plant Cell* 7: 1545-1554.

Stadler R, Sauer N. 1996. The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Botanica Acta* 109: 299-306.

Stadler R, Truernit E, Gahrtz M, Sauer N. 1999. The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in

Arabidopsis. *Plant Journal* 19:269-278.

Toyofuku K, Kasahara M, Yamaguchi J. 2000. Characterization and expression of monosaccharide transporters (OsMSTs) in rice. *Plant Cell Physiol.* 41: 940–947

Truernit E, Sauer N. 1995. The promoter of the Arabidopsis thaliana SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem – evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196 : 564-570.

Truernit E, Schmid J, Epple P, Illig J, Sauer N. 1996. The sink-specific and stress-regulated Arabidopsis STP4 gene: Enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding elicitors and pathogen challenge. *Plant Cell* 8 : 2169-2182.

Truernit E. 2001. Plant physiology: The importance of sucrose transporters . *Curr Biol* 11: R169-R171.

Tubbe A, Buckhout TJ. 1992. In vitro analysis of the H<sup>+</sup>-hexose symporter on the plasma membrane of sugarbeets (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 99:945-951

Turgeon R. 1996 Phloem loading and plasmodesmata. *Trends Plant Sci.* 1: 418–423.

Walker NA, Patrick JW, Zhang WH, Fieuw S. 1995. Efflux of photosynthate and acid from developing seed coats of *Phaseolus-vulgaris* L – a chemiosmotic analysis of pump driven efflux. *Journal of Experimental Botany* 46: 539-549.

Ward JM, Kuhn C, Tegeder M, Frommer WB. 1998. Sucrose transport in higher plants. *International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology* Vol 178 : 41-71.

Weber A, Servaites JC, Geiger DR. 2000. Identification purification and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* 12: 787-801.

Weschke W, Panitz R, Gubatz S, Wang Q, Radchuk R, Weber H, Wobus U. 2003. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant Journal* 33: 395-411.

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 Journal* 21: 455-467.

Williams LE, Lemoine R, Sauer N. 2000. Sugar transporters in higher plants - A diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* 5: 283-290.

Van Dillewijn C. 1952. Botany of sugarcane, first edition. EUA.

Ylstra B, Garrido D, Busscher J, Van-Tunen AJ. 1998. Hexose transport in growing *Petunia* pollen tubes and characterization of a pollen-specific putative monosaccharide transporter. *Plant Physiology* 118: 297–304.

Zhu B, Choi DW, Fenton R, Close TJ. 2000. Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance. *Molecular and General Genetics* 264 :145-153.

## LEGENDAS

**Tabela 1. Proteínas transportadoras de hexoses e sacarose identificadas por datamining no banco de dados do SUCEST.** <sup>1</sup> Prováveis transportadores de hexose e sacarose em cana-de-açúcar; <sup>2</sup> Proteínas transportadoras de hexose e sacarose identificadas em outras espécies de plantas homólogas a SUCEST-assembled sequences. A similaridade protéica e seu respectivo valor de e-value foram obtidos utilizando a matriz BLOSUM62 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Figura 1. Árvore filogenética de transportadores de hexose em plantas construída pelo método de neighbor-joining.** As sequências de aminoácidos foram alinhadas e uma árvore filogenética sem raiz foi criada utilizando-se os programas ClustalX (v1.83) e TreeView (v1.6.6). Os valores de *bootstrap* estão indicados nos ramos da árvore (percentagem; 1.000 repetições). Os transportadores de hexose identificados em cana-de-açúcar estão em negrito e itálico.

**Figura 2. Árvore filogenética de transportadores de sacarose em plantas construída pelo método de neighbor-joining.** As sequências de aminoácidos foram alinhadas e uma árvore filogenética sem raiz foi criada utilizando-se os programas ClustalX (v1.83) e TreeView (v1.6.6). Os valores de *bootstrap* estão indicados nos ramos da árvore (percentagem; 1.000 repetições). Os transportadores de sacarose identificados em cana-de-açúcar estão em negrito e itálico.

**Figura 3. Análise de expressão de SAS de cana-de-açúcar codificantes para transportadores de mono e dissacarídeos.** A figura à esquerda representa a análise de expressão por RNA blot em diferentes tecidos de cana-de-açúcar. Folhas maduras (FM) e imaturas (FI), entrenós imaturos (EI), raiz (RZ), gema lateral (GL) e flores (FL). A figura à direita representa a análise de expressão por RNA blot em entrenós imaturos (E1), intermediários (E5) e maduros (E9) de uma população de cana-de-açúcar segregante para teor de açúcar: (AB) – amostras de alto teor de açúcar e (BB) amostras de baixo teor de açúcar. 7 e 11 MAPs representam meses após plantio. (A) Análise de RNA blot para SAS

codificantes para transportadores de monossacarídeos, (B) Análise de RNA blot para SAS codificantes para transportadores de disacarídeos e (C) Hibridização com RNA ribossomal.

**Figura 4a.** *Análise de expressão comparativa entre amostras de alto e baixo teor de açúcar de SAS de cana-de-açúcar codificantes para transportadores de monossacarídeos.*

A figura demonstra o perfil de expressão desses transportadores, comparando-se diretamente amostras de alto (AB) e baixo (BB) teor de açúcar. A comparação foi feita a partir dos dados de expressão observados na figura 3.

**Figura 4b.** *Análise de expressão comparativa entre amostras de alto e baixo teor de açúcar de SAS de cana-de-açúcar codificantes para transportadores de dissacarídeos.*

A figura demonstra o perfil de expressão desses transportadores, comparando-se diretamente amostras de alto (AB) e baixo (BB) teor de açúcar. A comparação foi feita a partir dos dados de expressão observados na figura 3.

**Figura 5.** *Detecção de transcritos de transportadores de açúcar em entrenós imaturos de cana-de-açúcar.*

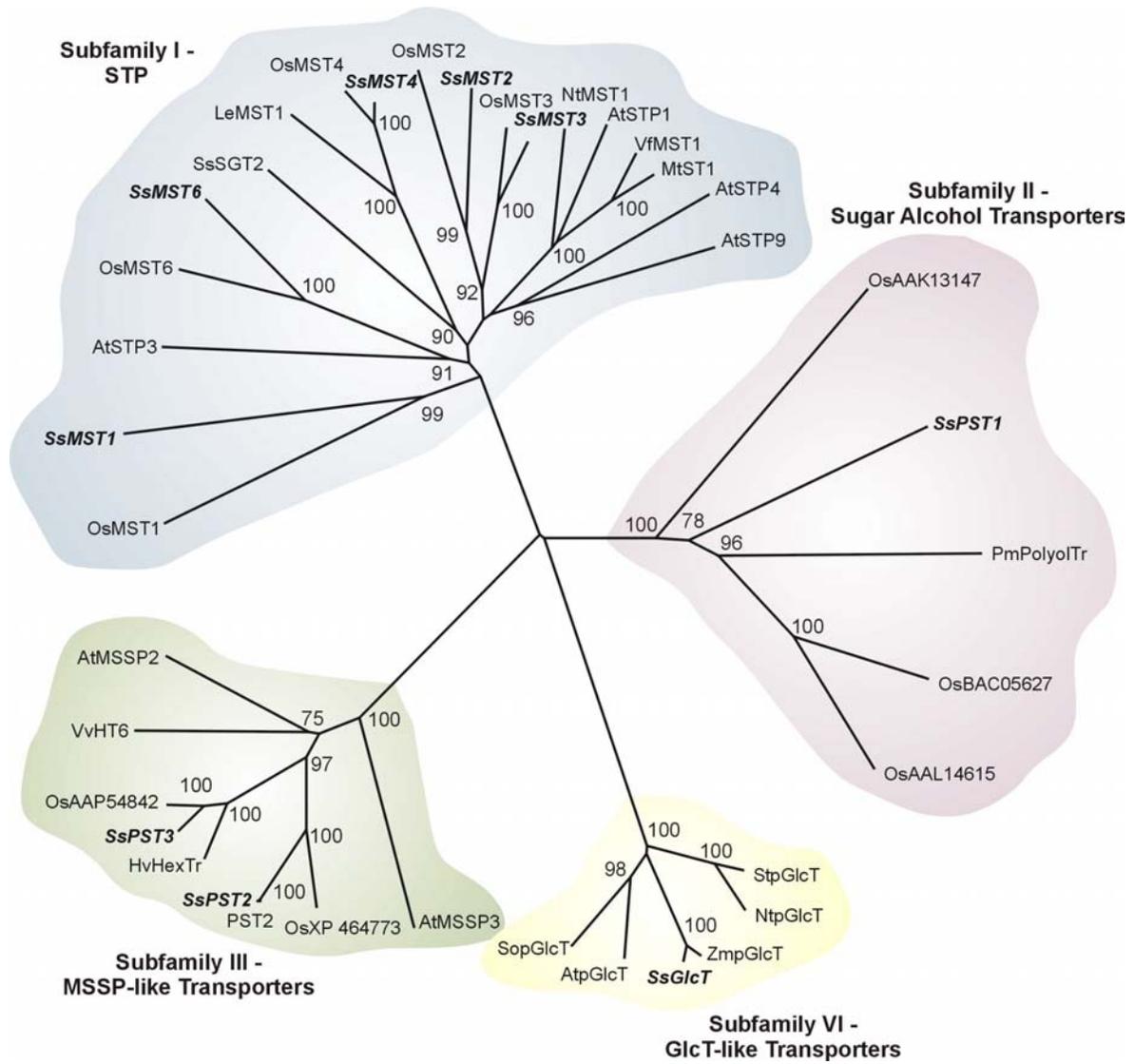
(A) Em um corte hibridizado com a sonda antisense de *SsMST1* observa-se a maior parte de transcritos presentes no parênquima vascular (PV), indicados pelas setas. (B) Para a sonda antisense de *SsPST3* observa-se a presença de transcritos nas células companheiras (CC) e também nas células do parênquima proximal do floema (PP-FL) e do protoxilema (PP-PX), indicados pelas setas. (C) Para a sonda antisense de *SsGlcT* a maior parte de transcritos está presente nos tubos crivados (TC) e nas células companheiras (CC), além de estar presente também nas células do parênquima proximal do protoxilema (PP-PX), indicados pelas setas. (D) Um corte similar foi hibridizado com a sonda *SsMST1* sense, não apresentando hibridização. (PV, parênquima vascular; TC, tubo crivado; CC, células compnaheiras; PP-FL, células do parênquima proximal do floema; PP-PX, células do parênquima proximal do protoxilema; PX, parênquima do xilema; MX, metaxilema; PTX, protoxilema; F, fibras).

**Figura 6.** *Corte transversal de entrenó imaturo de cana-de-açúcar tratado com iodeto de potássio.* Cortes de entrenó imaturo de cana-de-açúcar foram submetidos a tratamento com

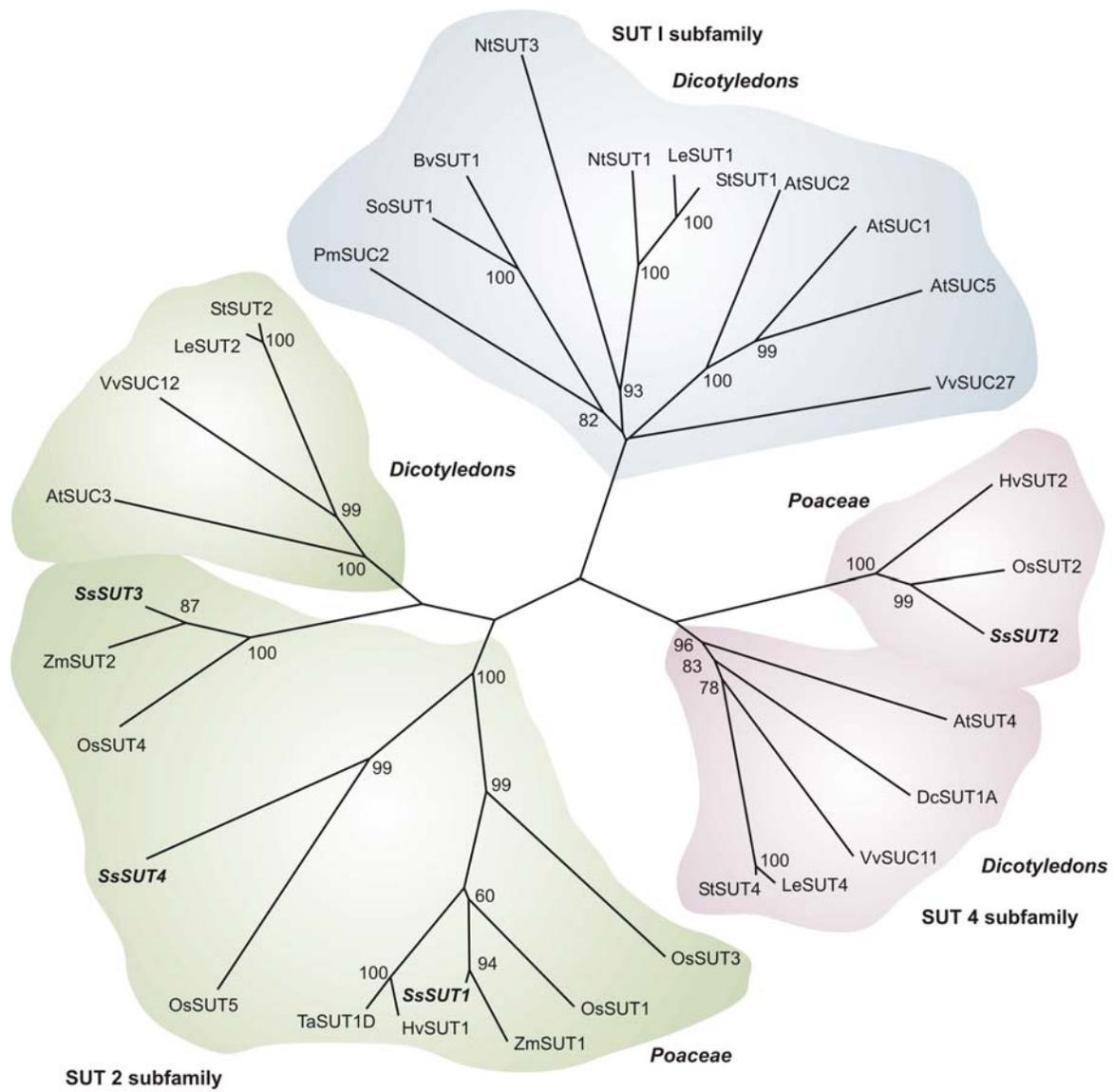
iodeto de potássio. Em (A) observa-se uma visão geral do feixe vascular e a presença de grãos de amido nas células do mesófilo. Em (B) temos uma visão mais aproximada dos grãos, indicados pelas setas.

PST <sup>1</sup>	SAS <sup>2</sup>	Número de acesso	Similaridade protéica	E value	Referência
SsMST1	SCQGST3153F06.g	BAB19862.1	monosaccharide transporter 1 [Oryza sativa]	e-140	Toyofuku et al, 2000
SsMST2	SCEQRT2091B02.g	BAB19863.1	monosaccharide transporter 2 [Oryza sativa]	6e-45	Toyofuku et al, 2000
SsMST3	SCCCCL4002E09.g	BAB19864.1	monosaccharide transporter 3 [Oryza sativa]	e-150	Toyofuku et al, 2000
SsMST4	SCEQRT1028H05.g	AAQ24871.1	monosaccharide transporter 4 [Oryza sativa]	3e-42	Wang and Zhu, unpublished
SsMST6	SCRLRZ3043D02.g	T10124	hexose transport protein HEX6 (Ricinus communis)	e-175	Weig et al, 1994
SsPST1	SCEZRZ3016G06.g	CAD58709.1	polyol transporter [Plantago major]	e-123	Ramsperger-Gleixner et al, 2004
SsPST2	SCSFRT2067F07.g	AAQ37640.1	putative sugar transporter type 2a [Saccharum hybrid cultivar]	0.0	Casu et al, 2003
SsPST3	SCVPRT2073F05.g	CAD58958.1	hexose transporter [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	0.0	Weschke et al, 2003
SsGlcT	SCEZLR1009H06.g	AAF74568.1	hexose transporter [Zea mays]	0.0	Weber et al, 2000
SsSUT1	SCQGRZ3013F11.g	AAV41028	sucrose transporter [Saccharum hybrid cultivar]	3e-58	Rae et al, 2004
SsSUT2	SCEPLR1008A12.g	BAC67163.1	sucrose transporter [Oryza sativa]	0.0	Aoki et al, 2003
SsSUT3	SCSBAM1084D02.g	AAS91375.1	sucrose transporter 2 [Zea mays]	1e-48	Wang et al, unpublished
SsSUT4	SCJFST1012A09.g	BAC67165.1	sucrose transporter [Oryza sativa]	7e-58	Aoki et al, 2003

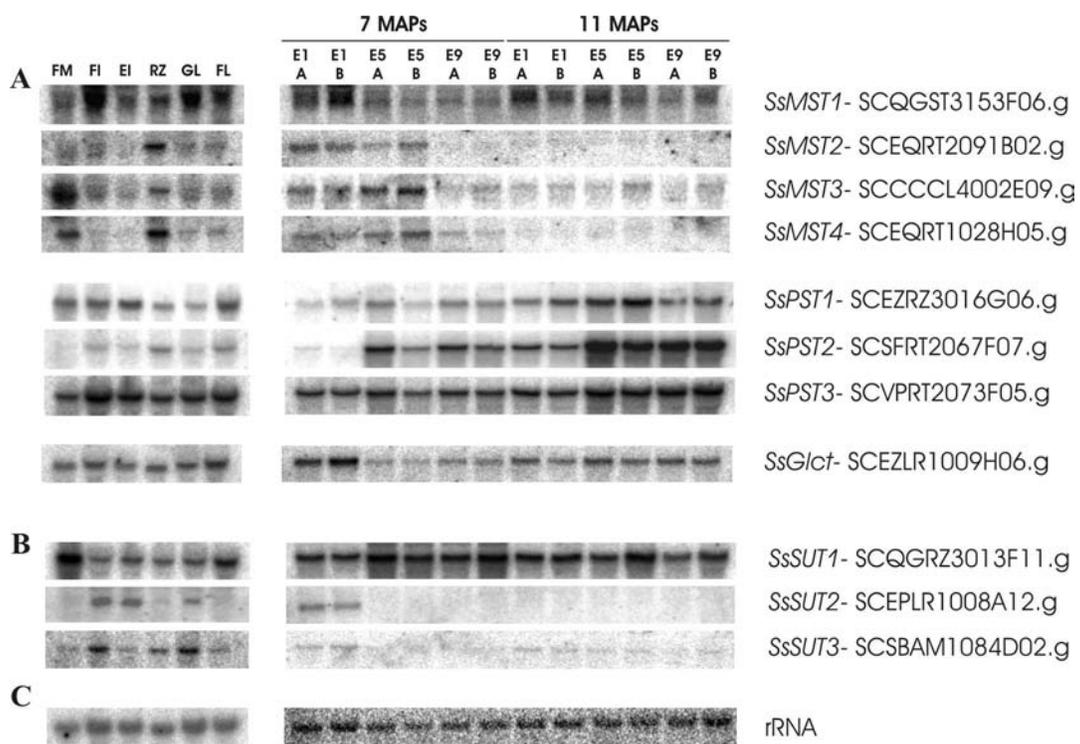
**Tabela 1**



**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**

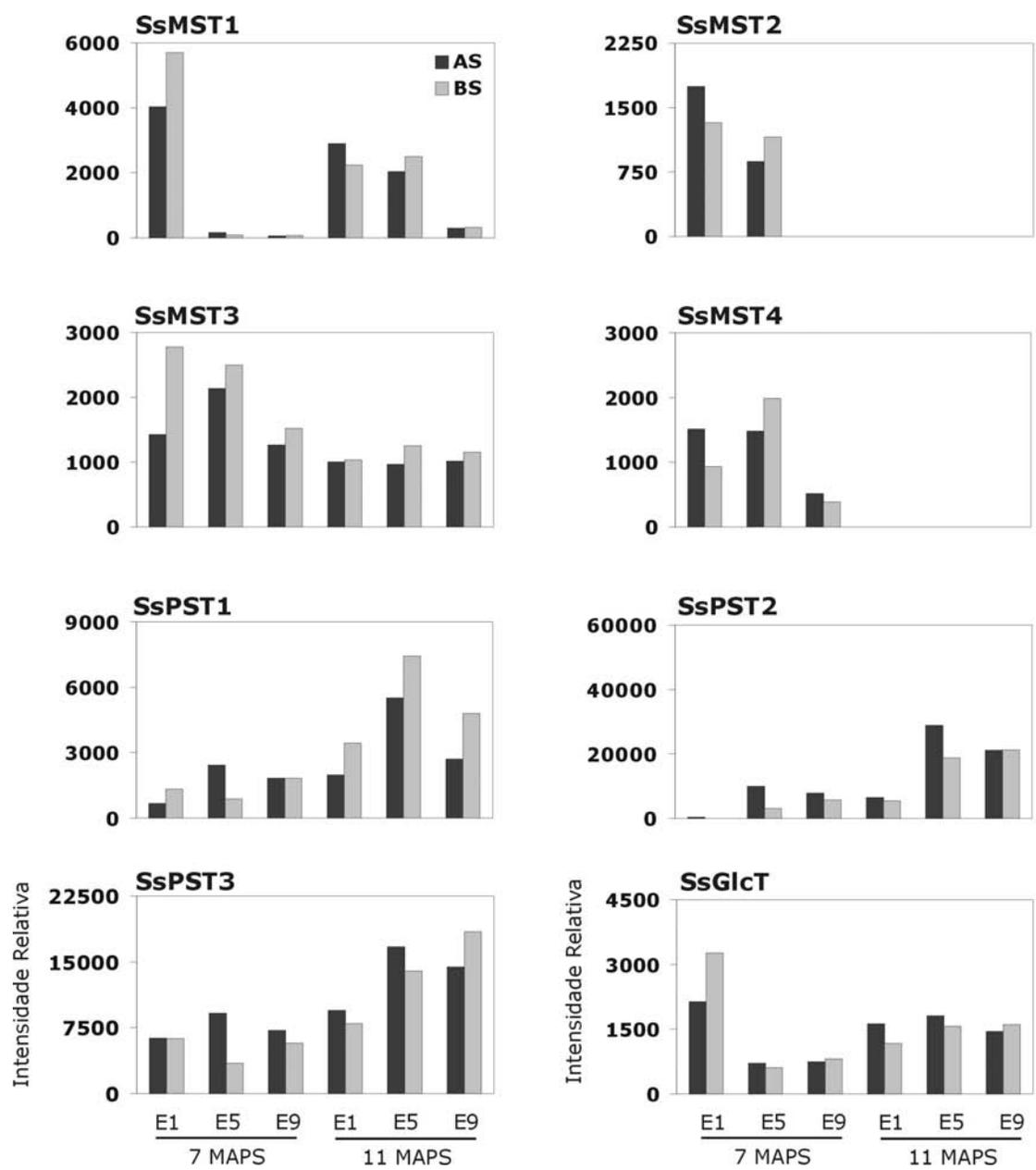


Figura 4a

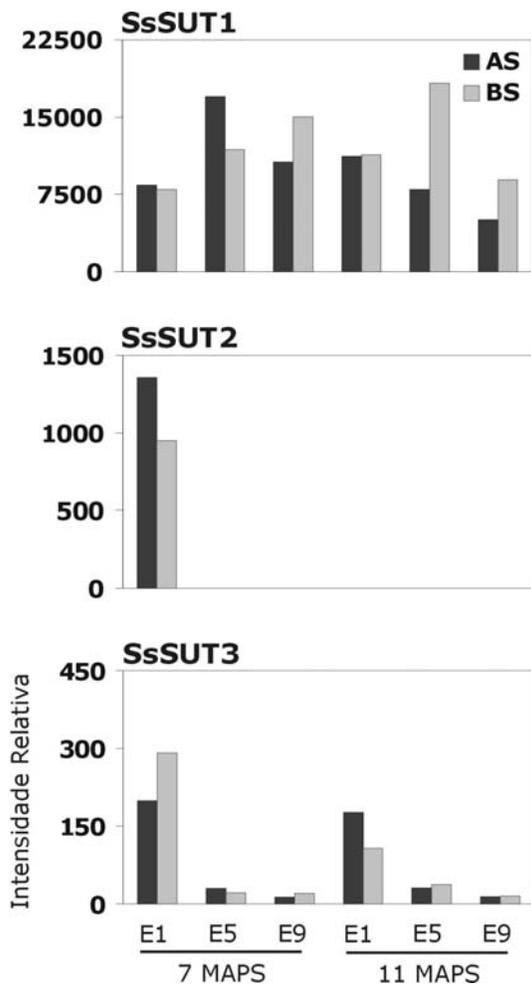
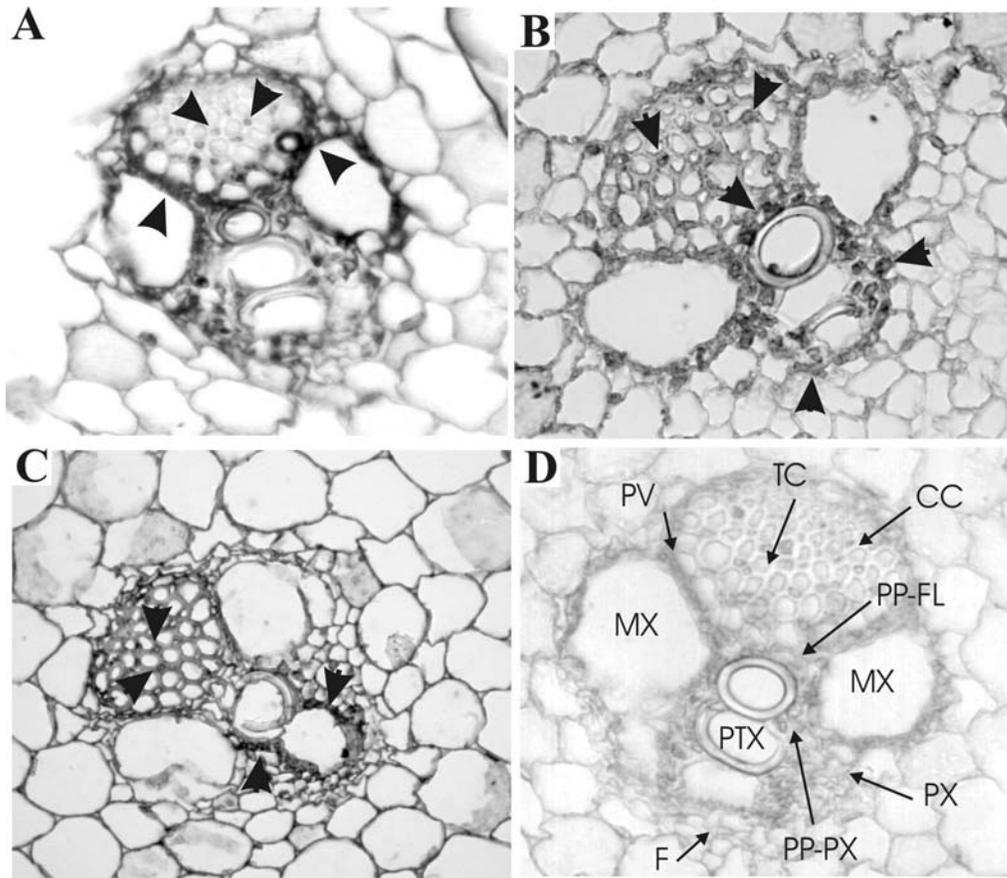
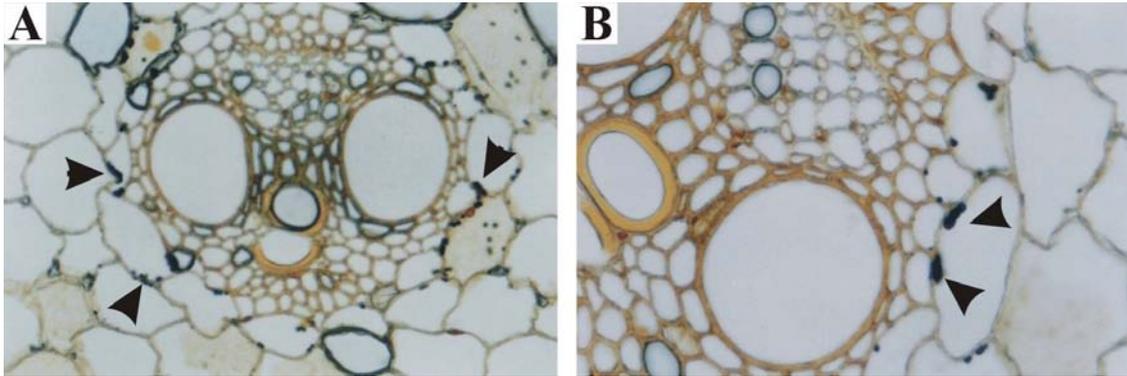


Figura 4b



**Figura 5**



**Figura 6**

## CONCLUSÕES

---

O objetivo principal deste projeto foi a identificação e caracterização de genes associados a síntese e acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar. A verificação do padrão de expressão desses genes é essencial para que se possa inferir sua função nos diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento da planta de forma que essas informações possam ser utilizadas em programas de melhoramento que beneficiem a agroindústria da cana. A identificação de genes neste presente trabalho teve 4 frentes de pesquisa, sendo que os resultados obtidos permitiram concluir que:

I. Nossos resultados permitiram visualizar o perfil de expressão gênica dos elementos de transdução de sinal em diferentes tecidos de cana-de-açúcar. Com essa análise foi possível identificar genes exclusivamente expressos em alguns tecidos como entrenós e folhas, além daqueles com expressão ubíqua. Esses genes podem vir a ser utilizados como controle em experimentos ou bem para a clonagem de promotores para uso em plantas transgênicas.

II. Foi encontrada uma baixa variabilidade na expressão gênica ao comparar indivíduos de cana-de-açúcar pertencentes a uma mesma soca. Esses resultados indicam que não há necessidade de analisar um grande número de plantas para representar uma população em um experimento.

III. O baixo teor de sacarose em folhas parece coordenar sinais específicos para a regulação da enzima SPS, uma vez que genes codificantes para proteínas envolvidas na regulação dessa via foram consideradas mais expressas em indivíduos de cana-de-açúcar segregantes para baixo teor de sacarose.

IV. O baixo teor de sacarose também parece desencadear um possível estresse nutricional na planta, visto a grande quantidade de genes de resposta a estresse mais expressos em indivíduos de cana-de-açúcar segregantes para baixo teor de sacarose.

V. A análise de expressão gênica em entrenós em desenvolvimento permitiu visualizar a vasta gama de processos fisiológicos que possivelmente estão envolvidos na relação fonte-dreno de acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar.

VI. Nossos resultados condizem com a proposta de que vias de sinalização do metabolismo de carbono interagem com as vias de resposta a hormônios e patógenos, uma vez que transcritos codificantes para genes participantes de diversas vias de biosíntese de hormônios (tais como etileno, auxina, jasmonato) e proteínas PR foram diferencialmente expressos.

VII. A maior parte dos ESTs diferencialmente expressos em nossas análises de expressão gênica estão catalogados como envolvidos com estresse, o que sugere a existência de uma possível relação entre genes de resposta a estresse e sinalização por açúcar.

VIII. A cana-de-açúcar possui transportadores de açúcar pertencentes às famílias de dissacarídeos e de monossacarídeos. O fato de não termos encontrado correlação entre sua expressão e o acúmulo de sacarose sugere que, em níveis normais, a expressão destes transportadores não é responsável pela diferença de teor de açúcar encontrada entre esses indivíduos.

IX. Não foi observada a expressão de transportadores de monossacarídeos em entrenós maduros, corroborando com a hipótese de que existe um descarregamento apoplástico em entrenós imaturos de cana-de-açúcar e um descarregamento simplástico em entrenós maduros, devido à formação de uma barreira apoplástica.

X. Por apresentar uma maior expressão em tecidos dreno e ser localizado somente nas células do parênquima vascular, pode-se inferir que o gene *SsMST1* esteja provavelmente envolvido no descarregamento de hexoses nas células de estocagem.

XI. O gene *SsPST3* provavelmente participa na translocação de hexoses para os tecidos

dreno, dado que seus transcritos foram encontrados nas células companheiras e também nas células do parênquima proximal do floema e protoxilema.

XII. Ensaio com iodeto de potássio demonstraram a presença de grãos de amido em entrenós imaturos, corroborando nossa hipótese de que o gene *SsGlcT* possa estar participando na translocação de glicose gerada pela quebra do amido de reserva nesses entrenós, uma vez que esse tecido não é fotossinteticamente ativo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuc Ac Res* 25: 3389-3402
- Baxter CJ, Foyer CH, Turner J, Rolfe SA, Quick WP. 2003. Elevated sucrose-phosphate synthase activity in transgenic tobacco sustains photosynthesis in older leaves and alters development. 2003. *J Exp Bot* 54:1813-20
- Blohm DH, Guiseppi-Elie A. 2001. New developments in microarray technology. *Curr Opin Biotechnol* 12:41-7
- Botha FC, Black KG. 2000. Sucrose phosphate synthase and sucrose synthase activity during maturation of internodal tissue in sugarcane *Aust J Plant Physiol* 27: 81-85
- Bull TA, Glasziou KT. 1963. The evolutionary significance of sugar accumulation in *Saccharum*. *Aust J Biol Sc* 16: 737-742
- Burnquist WL. 2000. Os arquitetos da nova cana *Revista Pesquisa FAPESP* 59: 3-4
- Carson DL, Botha FC. 2000. Preliminary analysis of expressed sequence tags for sugarcane. *Crop Sci* 40: 1769-1779
- Carson DL, Botha FC. 2002. Genes expressed in sugarcane maturing internodal tissue *Pl Cell Rep* 20:1075-1081
- Carson DL, Hockett BI, Botha FC. 2002. Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue. *Pl Science* 162: 289-300
- Casu R, Dimmock C, Chapman S, Grof C, McIntyre CL, Bonnett G, Manners J. 2004. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. *Pl Mol Biol* 54: 503-517
- Casu RE, Grof CPL, Rae AL, McIntyre CL, Dimmock CM, Manners JM. 2003. Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. *Pl Mol Biol* 52:371-386
- Casu RE, Manners JM, Bonnett GD, Jackson PA, McIntyre CL, Dunne R, Chapman SC, Rae AL, Grof CPL. 2005. Genomics approaches for the identification of genes

determining important traits in sugarcane. *Field Crops Res* 92:137-147

Chavez-Barcenas AT, Valdez-Alarcon JJ, Martinez-Trujillo M, Chen L, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ, Herrera-Estrella L. 2000. Tissue-specific and developmental pattern of expression of the rice *sps1* gene. *Plant Physiology* 124:641-653

Chen S, Hajirezaei M, Bornke F. 2005a. Differential expression of sucrose-phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. *Plant Physiol* 139:1163-74

Chen GY, Yong ZH, Liao Y, Zhang DY, Chen Y, Zhang HB, Chen J, Zhu JG, Xu DQ. 2005b. Photosynthetic acclimation in rice leaves to free-air CO<sub>2</sub> enrichment related to both ribulose-1,5-bisphosphate carboxylation limitation and ribulose-1,5-bisphosphate regeneration limitation. *Plant Cell Physiol* 46:1036-45

de Araujo PG, Rossi M, de Jesus EM, Saccaro NL Jr, Kajihara D, Massa R, Felix JM, Drummond RD, Falco MC, Chabregas SM, Ulian EC, Menossi M, Van Sluys MA. 2005. Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid sugarcane. *Plant J* 44: 707-17

Ebrahim MKH, Zingsheim O, Veith R, Abo-Kassem EEM, Komor E. 1999. Sugar uptake and storage by sugarcane suspension cells at different temperatures and high sugar concentrations. *Journal of Plant Physiology* 154:610-616

Falco MC, Silva-Filho MC. 2003. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: Effects on natural defense against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Plant Physiology and Biochemistry* 41:761-766

Glasziou KT, Gayler KR. 1972. Sugar accumulation in sugarcane - role of cell-walls in sucrose transport. *Plant Physiology* 49: 912

Goetz M, Godt DE, Guivarc'h A, Kahmann U, Chriqui D, Roitsch T. 2001. Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6522-6527

Grivet L, Arruda P. 2001. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology* 5:122-127

Guimaraes CT, Sills GR, Sobral BWS. 1997. Comparative mapping of andropogoneae: *saccharum* L (sugarcane) and its relation to sorghum and maize *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14261-6

- Herbers K, Meuwly P, Frommer WB, Metraux JP, Sonnewald U. 1996. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: Possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 8:793-803
- Kuramae EE, Fenille RC, Rosa VE, Rosa DD, Ulian EC. 2002. Mining the enzymes involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) in sugarcane. *Mol Plant Pathol* 4:251-259
- Johansson H. 2003. Gene regulation of UDP-glucose synthesis and metabolism in plants. PhD thesis, Umeå University, Umeå, Sweden.
- Lingle SE. 1997. Seasonal internode development and sugar metabolism in sugarcane. *Crop Science* 37: 222-1227
- Lingle SE, Irvine JE. 1994. Sucrose synthase and natural ripening in sugarcane *Crop Science* 34:1279-1283
- Lueking A, Horn M, Eickhoff H, Bussow K, Lehrach H, Walter G. 1999. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Analytical Biochemistry* 270:103-111
- Lunn JE, Ashton AR, Hatch MD, Heldt HW. 2000. Purification, molecular cloning, and sequence analysis of sucrose-6(F)-phosphate phosphohydrolase from plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12914-12919
- Ma HM, Albert HH, Paull R, Moore PH. 2000. Metabolic engineering of invertase activities in different subcellular compartments affects sucrose accumulation in sugarcane cells. *Australian Journal of Plant Physiology* 27:1021-1030
- Mello MO, Tanaka AS, Silva-Filho MC. 2003. Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. *Mol Phylogenet Evol* 27:103-112
- Ming R, Liu SC, Moore PH, Irvine JE, Paterson AH. 2001. QTL analysis in a complex autopolyploid: Genetic control of sugar content in sugarcane. *Genome Research* 11:2075-2084
- Moore PH. 1995. Temporal and spatial regulation of sucrose accumulation in the sugarcane stem. *Australian Journal of Plant Physiology* 22:661-679
- Moore PH. 2005. Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: towards developing an understanding of the gene-to-crop continuum. *Field Crops Res* 92:119-135

- Nelson DL, Cox MM. 2000. Principles of Biochemistry Worth Publishers, New York
- Nogueira FTS, De Rosa VE, Menossi M, Ulian EC, Arruda, P. 2003. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiol* 132: 1811-1824
- Papini-Terzi FS , Rocha FR , Vêncio RZN, Oliveira KC, Felix JM, Vicentini R, Rocha CS, Simões ACQ, Ulian EC, di Mauro SMZ, Da Silva AM, Pereira CAB, Menossi M, Souza GM. 2005. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. *DNA Research* 12:27-38
- Pessoa-Jr A, Roberto IC, Menossi M, Dos Santos RR, Filho SO, Penna TC. 2005. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. *Appl Biochem Biotechnol* 121-124: 59-70
- Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW. 1998. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends in Biotechnology* 16:301-306
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470
- Soares-Costa A, Beltramini LM, Thiemann OH, Henrique-Silva F. 2002. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochem Biophys Res Commun* 296:1194-1199
- Souza GM, Simoes ACQ, Oliveira KC, Garay HM, Fiorini LC, Gomes FD, Nishiyama-Junior MY, da Silva AM. 2001. The sugarcane signal transduction (SUCAST) catalogue: prospecting signal transduction in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology* 24:25-34
- Taniguchi H, Nakamura T, Mizukami H, Kawano S, Sano H, Katsumi M. 2001. Identity of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) in Rebus Island: Comparative DNA analysis of related species. *Genes & Genetic Systems* 76:181-188
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* 270:484-487
- Vettore AL, da Silva FR, Kemper EL, Arruda P. 2001. The libraries that made SUCEST. *Genet Mol Biol* 24:1-7
- Vettore AL, da Silva FR, Kemper EL, Souza GM, da Silva AM, et al, 2003. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop

sugarcane. *Genome Res* 13:2725-2735

Whittaker A, Botha FC. 1999. Pyrophosphate : D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase activity patterns in relation to sucrose storage across sugarcane varieties. *Physiologia Plantarum* 107:379-386

Zhu YJ, Komor E, Moore PH. 1997. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiology* 115:609-616.