

ANDREA AKEMI HOSHINO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PROMOTORES
TECIDO-ESPECÍFICOS A PARTIR DAS INFORMAÇÕES DO
SUCEST (“SUGARCANE EXPRESSED SEQUENCE TAGS”)**

BOTUCATU - SP
2007



ANDREA AKEMI HOSHINO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PROMOTORES TECIDO-
ESPECÍFICOS A PARTIR DAS INFORMAÇÕES DO SUCEST
("SUGARCANE EXPRESSED SEQUENCE TAGS")**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista - Campus
de Botucatu (SP), para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas (Genética).

Orientador: Prof. Dr. Marcos Aparecido Gimenes

Co-Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

BOTUCATU – SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Hoshino, Andrea Akemi.

Isolamento e caracterização de promotores tecido específicos a partir das informações do SUCEST (Sugarcane Expressed Sequence Tags) / Andrea Akemi Hoshino . – Botucatu : [s.n.], 2007.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007

Orientador: Marcos Aparecido Gimenes

Co-orientador: Ivan de Godoy Maia

CAPES: 20203004

1. Genética vegetal 2. Cana de açúcar - Melhoramento genético 3. Clonagem - Cana-de-açúcar

CDD 581.16

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Raiz; Regulação da expressão gênica; Região promotora; Tecido específico

*Aos meus pais, Marica e Tsuguo,
e ao meu irmão, Ivan Sunao*



Agradecimientos

*A Deus,
porque sem Ele eu nada seria;*

À Universidade Estadual Paulista, pela estrutura e oportunidade;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro;

Ao Prof. Dr. Marcos A. Gimenes, pela orientação desde o mestrado;

Ao Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia, pela paciência e dedicação decisivas nestes últimos anos;

Ao Dr. Paulo de Lucca e a Alellyx, pela disponibilidade e ajuda imprescindíveis;

Ao Dr. Felipe Silva, pela ajuda nas análises de bioinformática;

Ao Dr. Antonio Sérgio, pela orientação com as análises filogenéticas;

Ao Dr. Cláudio Oliveira e a Luciana pelo auxílio nas etapas de seqüenciamento;

Ao Dr. Paulo Ribolla e seus alunos pela ajuda e disponibilidade permanentes;

Ao Dr. André Vettore, pelo apoio nas primeiras validações;

À Dra. Vera Quecini, pelas sugestões e atenção incomparável;

À Dra. Catalina Romero Lopes, pelo exemplo, apoio e atenção dispensados;

Às minhas grandes amigas: Fernanda, Karina, Luciana, Regiane, Wanessa, que sempre estiveram presentes e sem as quais não seria nem metade de mim;

Às “meninas do laboratório” e que serão minhas eternas amigas: Adriana, Andrea, Edna, Paula, com vocês vivi o sentido da palavra GRUPO;

Aos amigos do BDCGEM e dos anos em Botucatu, tantos e tão importantes.

Aos professores e funcionários que deram sua contribuição para a minha formação e confecção deste trabalho;

Aos amigos de todas as épocas, impossível de listar todos, mas inesquecíveis e vitais;

Muito Obrigada!



Epigrafe

*"I only know that I don't know anything,
and even of that I am not sure."*

Sócrates (470 a.C. - 399 a.C.)

*"Life is short, [the] art long, opportunity fleeting, experiment
treacherous, judgment difficult."*

Hippocrates (460 a.C. - 377 a.C.)



Resumo

A cana-de-açúcar é uma gramínea largamente cultivada em muitos países para produção de açúcar, álcool e, mais recentemente, de energia elétrica. Pela sua grande importância econômica, a pesquisa em cana-de-açúcar tem recebido grandes incentivos que viabilizaram o seqüenciamento de seu transcriptoma (Projeto SUCEST). Dentre os diversos desdobramentos do projeto SUCEST, a possibilidade de busca de promotores com características específicas empregando o banco de seqüências expressas (EST) gerado é uma das mais interessantes. O promotor é o processador central da regulação de um gene por conter os sítios de ligação para as RNA polimerases, responsáveis pela transcrição gênica. Para viabilizar a obtenção de promotores tecido-específicos em cana, uma busca no banco de dados do SUCEST foi realizada e *clusters* com padrão de expressão tecido-específico foram selecionados *in silico* e posteriormente validados por RT-PCR. Dois candidatos que codificam, respectivamente, uma proteína transportadora de lipídios (SCCART1004A07) e uma aquaporina (SCBGRT1052E01), com expressão específica em raiz, foram selecionados. As seqüências promotoras correspondentes foram isoladas por TAIL-PCR e as análises funcionais foram conduzidas empregando dois fragmentos promotores de tamanhos diferentes para cada um dos candidatos investigados. A versão curta (C2) da seqüência promotora do candidato SCCART1004A07 foi testada de maneira estável em tabaco e de forma transiente em cana-de-açúcar. Os resultados obtidos indicam que esta seqüência é transcricionalmente ativa nessas espécies, embora não seja capaz de promover a expressão do gene repórter GUS de maneira específica. As versões C1 e L1, que correspondem, respectivamente, às versões curta e longa da região promotora do candidato SCBGRT1052E01, foram fusionadas ao gene GUS e analisadas em transformação estável em cana-de-açúcar. Embora nenhuma atividade da enzima β -glucoronidase tenha sido observada nos ensaios histoquímicos utilizando diferentes órgãos/tecidos das plantas transformadas, a transcrição do gene GUS ligado à parte do fragmento promotor foi observada em ensaios de RT-PCR empregando RNA total extraído dessas plantas. Essa expressão inesperada pode ter sido causada por rearranjos ocorridos durante a transformação das plantas por biobalística.

Palavras-chave: cana-de-açúcar; isolamento da região promotora; padrão de expressão tecido-específico; raiz; SUCEST.



Abstract

Sugarcane is a gramineous broadly cultivated in many countries for sugar, alcohol and, more recently, electric power production. Due to its great economical importance, the sugarcane research has been receiving large incentives, which made it possible its transcriptome sequencing (SUCEST Project). Among the several unfoldings of SUCEST project, the possibility of searching for promoters with specific characteristics using the generated expressed sequence tags database is one of the most interesting. The promoter is the central processor of gene regulation for containing the DNA sequence elements that are recognized by RNA polymerases, responsible for gene transcription. In order to enable tissue-specific promoter cloning in sugarcane, a search in SUCEST database was accomplished and clusters with tissue-specific expression pattern were selected *in silico* and later validated by RT-PCR. Two candidates that, respectively, codify a lipid transfer protein (SCCCRT1004A07) and an aquaporin (SCBGRT1052E01), with specific expression in root, were selected. Their promoter sequences were isolated by TAIL-PCR and functional analyses were led using two promoter fragments with different length for each candidate. The short version (C2) of SCCCRT1004A07 promoter was tested in stably transformed tobacco plants and in sugarcane transiently. The obtained results indicate that this sequence is transcriptionally active in both species, although not capable to promote tissue-specific expression of GUS. The versions C1 and L1, which correspond to the short and long versions of SCBGRT1052E01 putative promoter, respectively, were fused to GUS and analyzed in stably transformed sugarcane. Although any activity of GUS has been observed in histochemical analysis using different organs/tissues of the transformed plants, the transcription of GUS linked to promoter sequences was observed in RT-PCR amplifications using total RNA extracted from those plants. The unexpected expression of the inserted promoter sequences might have been caused by rearrangements that happened during the biolistic transformation of the plants.

Keywords: sugarcane; promoter isolation; tissue-specific expression; root; gene regulation.



Lista de Tabelas

Tabela 1 – Registros de patentes para seqüências promotoras de monocotiledôneas encontrados no banco <i>Patent Lens</i>	58
Tabela 2 – Seqüências promotoras caracterizadas para espécies da família Poaceae.	58
Tabela 3 – Resultado das análises de similaridade (<i>Blast</i>), tecido-especificidade <i>in silico</i> e validação (RT-PCR) dos <i>clusters</i> com padrão de expressão tecido-específico selecionados <i>in silico</i> do banco SUCEST. A seqüência dos oligonucleotídeos e o tamanho esperado dos produtos de amplificação (pb) da validação também são apresentados.....	67
Tabela 4 – Oligonucleotídeos desenhados para a realização de TAIL-PCR da região promotora dos candidatos com expressão específica em raiz.....	75
Tabela 5 – Oligonucleotídeos usados na amplificação da região promotora dos candidatos SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01 para posterior clonagem em vetor de expressão.....	77
Tabela 6 – Resultado do TAIL-PCR para os candidatos SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01 indicando o numero de oligonucleotídeos randômicos testados e o tamanho dos fragmentos obtidos.....	96



Lista de Figuras

-
- Figura 1** – Vias de transdução de sinal ABA dependentes e independentes. ABRE é o principal elemento em resposta a ABA e os fatores de transcrição desta via são os AREB/ABFs. MYB2 e MYC2 e NAC também são induzidos por ABA, sensíveis ao JA e podem estar relacionados à resposta a estresses bióticos. DRE é o principal elemento das vias independentes de ABA, os fatores DREB1/CBFs estão envolvidos na resposta ao frio, DREB2s na resposta a desidratação e alta salinidade e NAC e HD-ZIP à seca e salinidade, mas não ao frio. (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007)..... 43
- Figura 2** – *Clusters* validados por RT-PCR com padrão de expressão tecido-específico. FE – folha enrolada; FJ – folha jovem; F+1 – folha +1; R8 – raiz com 8 dias; R20 – raiz com 20 dias; RM – raiz madura; E1 – entrenó 1; E4 – entrenó 4; EM – entrenó maduro; C – casca; BF – bainha da folha, I – inflorescência e S – semente..... 90
- Figura 3** – Árvore filogenética gerada pelo método de *neighbor-joining* empregando seqüências similares a SCCCRT1004A07 de diferentes espécies de plantas. *Arabidopsis thaliana* (Atha), *Glycine max* (Gmax), *Medicago truncatula* (Mtru), *Nicotiana tabacum* (Ntab), *Oryza sativa* (Osat), *Populus nigra* (Pnig), *Populus trichocarpa* (Ptri), *Saccharum officinarum* (TSoff –TIGR; SSoff – SUCEST), *Triticum aestivum* (Taes) e *Zea mays* (Zmay). Grupos coloridos são formados por seqüências de uma única espécie; grupo cinza é composto por espécies de Rosids. Valores significativos de *bootstrap* são indicados..... 92
-

-
- Figura 4** – Modelo da estrutura parcial da proteína codificada por SCCCRT1004A07. A e D – Representação em fita; B e E – Superfície semi-transparente/fita; C e F – Representação da superfície. Regiões hidrofóbicas em laranja e polares em azul. Aminoácidos conservados nas 84 seqüências analisadas em rosa e variáveis em verde. Cavidade hidrofóbica (setas) concentra aminoácidos conservados..... 93
- Figura 5** – Expressão relativa dos candidatos com expressão tecido-específica SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01 em raízes de diferentes idades, quantificada através de PCR em tempo real. Foram utilizados como referências o gene da poliubiquitina (SCCCST2001G02) e raiz madura..... 94
- Figura 6** – Seqüência de 1139 pb correspondente à região promotora do candidato SCCCRT1004A07, com indicação dos elementos de regulação *cis* putativos, segundo análise no banco de dados PLACE. Elementos de regulação com localização esperada estão destacados em cinza. Região 5' não traduzida em letras minúsculas..... 99
- Figura 7** – Seqüência de 1040 pb correspondente à região promotora do candidato SCBGRT1052E01, com indicação dos elementos de regulação *cis* putativos, segundo análise no banco de dados PLACE. Elementos de regulação com localização esperada estão destacados em cinza. Região 5' não traduzida em letras minúsculas..... 100
- Figura 8** – Esquema representativo do cassete de expressão dos vetores pCAMBIA-1381 e pCAMBIA-1381Z contendo fragmentos promotores putativos..... 101
-

-
- Figura 9** – Ensaio de expressão transiente em plântulas de cana-de-açúcar empregando o gene GUS sob controle de seqüências promotoras putativas específicas de raiz. A e B – controle positivo (*Ubi-1::GUS*); C e D – fragmento C2::GUS; E e F – demais construções; A, C e E – parte aérea; B, D e F – raízes..... 103
- Figura 10** – Análise histoquímica da atividade GUS nos órgãos/tecidos de plantas de cana transformadas com cassete de expressão contendo as seqüências promotoras putativas C1 e L1 específicas de raiz. A – folha; B – raiz e C – bainha da folha..... 103
- Figura 11** – Resultado da amplificação de cDNAs de folha, raiz e entrenó de plantas de cana-de-açúcar transformadas com o plasmídeo pCAMBIA-1381Z contendo as versões C1 e L1 do candidato com expressão específica em raiz SCBGRT1052E01. Foram analisadas duas plantas contendo o fragmento C1 e 10 plantas contendo o fragmento L1 com oligonucleotídeos GUS F e R, GUS R e SCBGRT1052E01/C1 F e SCCCRT1004A07/C2 F e R..... 106
- Figura 12** – Ensaio histoquímico da atividade GUS em órgãos/tecidos de plântulas de tabaco transformadas com a versão C2. Tecidos da planta controle 35S::GUS (A, C, E e G); Tecidos das plantas transformadas com a versão C2 do candidato SCCCRT1004A07 (B, D, F e H). A e B – folha; C e D – pecíolo; E e F – caule e G e H – raiz..... 108
-



Sumário

Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Figuras.....	xvii
1. Introdução.....	25
2. Revisão Bibliográfica.....	29
2.1 Cana-de-açúcar.....	30
2.1.1 Origem.....	30
2.1.2 Importância econômica.....	32
2.1.3 Aumento da demanda na produção de álcool.....	35
2.1.4 Estresses que afetam a cultura.....	38
2.2 Melhoramento genético.....	45
2.2.1 Melhoramento clássico.....	45
2.2.2 Engenharia genética.....	48
2.3 Regulação da expressão gênica.....	51
2.4 Isolamento da região promotora.....	55
2.5 A busca por promotores: propriedade intelectual e patentes.....	57
3. Objetivos.....	59
4. Material e Métodos.....	61
4.1 Identificação de <i>clusters</i> com padrão de expressão tecido-específico no banco do SUCEST.....	62
4.1.1 Seleção de <i>clusters</i>	62
4.1.2 Análise das seqüências.....	62
4.2 Confirmação da expressão tecido-específica por PCR.....	63
4.2.1 Desenho de oligonucleotídeos.....	63
4.2.2 Extração de RNA total de diferentes órgãos/tecidos de cana-de-açúcar..	63
4.2.3 Validação da expressão tecido-específica dos ESTs candidatos.....	65

4.3 Análises filogenéticas e estruturais.....	65
4.4 Quantificação da expressão tecido-específica por PCR em tempo real.....	69
4.5 Determinação do sítio de início de transcrição dos candidatos validados.....	70
4.5.1 Geração dos fragmentos e clonagem.....	70
4.5.2 Obtenção e análise de seqüências.....	71
4.6 Isolamento de seqüências promotoras por TAIL-PCR.....	72
4.6.1 Extração de DNA genômico de cana-de-açúcar.....	72
4.6.2 Desenho dos oligonucleotídeos.....	73
4.6.3 Amplificação e clonagem das seqüências promotoras.....	74
4.6.4 Obtenção e análise das seqüências promotoras.....	75
4.7 Clonagem em vetor de expressão para transformação de plantas.....	76
4.7.1 Desenho de oligonucleotídeos.....	76
4.7.2 Amplificação e clonagem dos fragmentos.....	77
4.8 Ensaios de expressão transiente em cana-de-açúcar.....	79
4.8.1 Biobalística.....	79
4.8.2 Análise histoquímica de GUS.....	79
4.9 Análise funcional dos promotores em plantas de cana-de-açúcar.....	80
4.9.1 Obtenção das plantas transgênicas.....	80
4.9.2 Análise histoquímica de GUS.....	81
4.9.3 Análise da expressão do gene GUS por RT-PCR.....	82
4.10 Análise funcional dos promotores em plantas de tabaco.....	82
4.10.1 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	82
4.10.2 Obtenção das plantas de tabaco transgênicas.....	84
4.10.3 Análise histoquímica de GUS.....	85
5. Resultados.....	86
5.1 Identificação de <i>clusters</i> com padrão de expressão tecido-específico no banco do SUCEST.....	87
5.1.1 Seleção de <i>clusters</i>	87
5.1.2 Análise das seqüências.....	87
5.2 Confirmação da expressão tecido-específica por RT-PCR.....	88
5.2.1 Desenho de oligonucleotídeos.....	88
5.2.2 Validação da expressão tecido-específica dos ESTs candidatos.....	89
5.3 Análises filogenéticas e estruturais.....	90
5.4 Quantificação da expressão tecido-específica por PCR em tempo real.....	93

5.5 Determinação do sítio de início de transcrição dos candidatos validados.....	95
5.6 Isolamento de seqüências promotoras por TAIL-PCR.....	95
5.6.1 Amplificação e clonagem das seqüências promotoras.....	95
5.6.2 Obtenção e análise das seqüências promotoras.....	96
5.7 Clonagem em vetor de expressão para transformação de plantas.....	101
5.8 Ensaio de expressão transiente em cana-de-açúcar.....	102
5.9 Análise funcional dos promotores em plantas de cana-de-açúcar.....	104
5.9.1 Análise das plantas transgênicas obtidas.....	104
5.9.2 Análise da expressão do gene GUS por RT-PCR.....	105
5.10 Análise funcional dos promotores em plantas de tabaco.....	107
6. Discussão.....	109
6.1 <i>Clusters</i> tecido-específicos.....	110
6.1.1 O candidato SCCCRT1004A07.....	112
6.1.2 O candidato SCBGRT1052E01.....	114
6.2 Isolamento de seqüências promotoras e análise funcional.....	116
6.2.1 Região promotora de SCCCRT10004A07.....	117
6.2.2 Região promotora de SCBGRT1052E01.....	121
7. Conclusões.....	124
8. Referências.....	126
Anexo.....	140



1. Introdução

monocotiledônea do gênero *Saccharum*. Este gênero é composto por seis espécies de número cromossômico e ploidia amplamente variáveis ($2n = 40-128$; $x = 5-16$; D'Hont et al., 1998; Amalraj & Balasundaram, 2006). As variedades cultivadas atualmente são híbridas, surgiram do cruzamento entre *Saccharum officinarum* e *S. spontaneum* (Lakshmanan et al., 2005) e tem entre $2n = 100$ e $2n = 130$ cromossomos (Grivet & Arruda, 2001).

A cana-de-açúcar tem grande valor econômico e tem sido cultivada em muitos países para produção de açúcar e álcool. Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo o Estado de São Paulo o responsável pela maior parte da produção. Estima-se que a demanda por álcool combustível aumente muito nos próximos anos, impulsionada principalmente pela substituição dos combustíveis fósseis por fontes de energia renováveis (Agrianual, 2006). A utilização do bagaço da cana-de-açúcar para a geração de energia elétrica também tem contribuído para o fortalecimento da cultura no país, por tornar as usinas auto-suficientes, diminuir despesas e gerar renda pela comercialização dos excedentes de energia.

Por ser uma cultura de grande importância econômica, a pesquisa em cana-de-açúcar tem recebido grandes investimentos no país, como o do projeto SUCEST (*SugarCane Expressed Sequence Tags*), que possibilitou a identificação de milhares de genes de cana-de-açúcar e que podem ser de grande interesse para o melhoramento da cana. A identificação e caracterização de genes têm permitido novas abordagens no melhoramento de várias espécies vegetais, como por exemplo, através de seleção assistida, identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) e produção de plantas transgênicas.

A transformação genética de plantas tem sido uma importante estratégia

para o melhoramento, pois permite a introdução de um ou poucos genes, muitos vezes encontrados em espécies distantes. A expressão de uma proteína heteróloga em uma planta transgênica depende da transcrição do gene introduzido e para isso, além da identificação de genes, que é um passo de extrema importância no melhoramento genético via transgenia, promotores ativos são necessários (Rance et al., 2002).

O isolamento de regiões promotoras pode ser realizado a partir da triagem de uma biblioteca genômica ou utilizando-se estratégias de *genome walking* ou TAIL-PCR (*Thermal Asymmetric Interlaced – Polymerase Chain Reaction*), mas antes é necessária a identificação dos genes com expressão tecido-específica e para isso são utilizadas técnicas para verificação da expressão diferencial, como o *northern* eletrônico ou o *northern blot*. Com base na sequência dos genes selecionados as sequências genômicas contendo as regiões promotoras são identificadas.

O promotor é o processador central da regulação de um gene, compreende a região 5' da sequência transcrita e contém os sítios de ligação para as RNA polimerases, responsáveis pela transcrição. Atualmente, os promotores mais utilizados na transformação genética de plantas são promotor do gene 35S (CaMV 35S), *nopalina sintase* (NOS) e *octopina sintase* (OCS) e ubiquitina (Ubi-1), do vírus do mosaico da couve flor, *Agrobacterium tumefaciens* e milho, respectivamente.

O uso de promotores constitutivos como os citados acima, tem sido uma das causas da grande preocupação a respeito dos efeitos dos transgênicos no meio ambiente. Promotores como o CaMV 35S determinam, em geral, a expressão do gene e a síntese do produto gênico em todos os tecidos da planta e que tende a diminuir a aceitação dos transgênicos pelos consumidores, pela ingestão da proteína inserida. Portanto, promotores tecido-específicos seriam de grande importância nestes casos e estudos já vem

sendo conduzidos com esse propósito.

Apesar do grande número de promotores tecido-específicos e induzidos já descritos, muito poucos são de cana-de-açúcar. Promotores tecido-específicos, particularmente para os tecidos de colmo e raiz, e induzidos por diferentes estresses seriam muito importantes para produção de biofábricas e no melhoramento da cultura. Por exemplo, a manipulação do acúmulo de produto no colmo, o controle da broca, de nematóides ou de vespas via transgenia dependerão largamente da disponibilidade de promotores que sejam específicos ou altamente ativos nos tecidos do colmo ou da raiz (Lakshmanan et al., 2005).



2. Revisão Bibliográfica

2.1 Cana-de-açúcar

2.1.1 Origem

Os cultivares modernos de cana-de-açúcar são híbridos interespecíficos do gênero *Saccharum* (do latim *saccharum* = açúcar). Este gênero pertencente à subtribo Saccharinae, tribo Andropogoneae da família Poaceae ou Gramineae, foi descrito em 1753 por Carl Linnaeus. Apesar do tempo decorrido desde a descrição deste gênero, sua composição, ainda hoje, é questionada, devido à grande dificuldade na determinação de suas espécies, causada pela intensa hibridação entre espécies e a geração de muitas formas intermediárias com números cromossômicos diferentes, aos polimorfismos entre euplóides e aneuplóides e as pressões de seleção da natureza e do homem (Amalraj & Balasundaram, 2006).

Em trabalho de revisão do gênero *Saccharum*, Irvine (1999) reconhece somente as duas espécies descritas por Linnaeus, *Saccharum officinarum* e *S. spontaneum*. Porém, segundo Amalraj & Balasundaram (2006) a classificação taxonômica mais aceita divide o gênero em seis espécies: *S. barberi* Jesw. ($2n = 111-120$), cultivada no norte da Índia, fina e de entrenós curtos; *S. edule* Hassk. ($2n = 60-80$), cultivada na Nova Guiné pelas inflorescências comestíveis; *Saccharum officinarum* L. ($2n = 80$), a cana nobre, cultivada pela alta produção de suco, alto teor de sucrose e baixo conteúdo de fibras; *S. robustum* Brandes et Jesw. ex Grassl ($2n = 60, 80$), espécie silvestre da Indonésia e Nova Guiné, são plantas altas, sem rizomas, de colmo grosso, inflorescências grandes e espiguetas pequenas; *S. sinense* Roxb. ($2n = 81-124$), conhecida como a cana chinesa e

representada por plantas altas, de folhas largas e entrenós em forma de bobina/carretel e *S. spontaneum* L. ($2n = 40-128$), espécie silvestre e altamente polimórfica com ampla distribuição geográfica.

O número básico de cromossomos em cana-de-açúcar foi intensamente debatido por muitos anos, até que D'Hont et al. (1998), utilizando a técnica de hibridação *in situ* para analisar duas famílias de RNA ribossomal, demonstraram que *S. officinarum* e *S. robustum* têm $x = 10$ e *S. spontaneum* possui $x = 8$, indicando que *S. officinarum* é octaplóide e *S. spontaneum* tem ploidia variável, entre 5 e 16.

Os primeiros cultivares híbridos de cana-de-açúcar surgiram no século XIX, do cruzamento entre a espécie até então cultivada, *S. officinarum*, de alto teor de sucrose, e *S. spontaneum*, uma espécie silvestre vigorosa. Após vários retrocruzamentos com *S. officinarum* foram obtidos cultivares com maior produtividade, resistentes a doenças e maior capacidade de rebrota e estas deram origem aos cultivares atuais (Lakshmanan et al., 2005). Os cultivares modernos de cana-de-açúcar têm entre $2n = 100$ e $2n = 130$ cromossomos e duas organizações cromossômicas distintas, que são consequência da diferença no número básico de cromossomos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Grivet & Arruda, 2001).

A cana-de-açúcar é bastante relacionada a duas outras espécies de grande interesse econômico, o sorgo (*Sorghum bicolor*) e o milho (*Zea mays*), que pertencem à mesma tribo. Estima-se que o sorgo e o milho divergiram de um ancestral comum à cerca de 24 milhões de anos atrás, enquanto o sorgo e a cana-de-açúcar divergiram a menos de cinco milhões de anos (Al-Janabi et al., 1994). Feuillet & Keller (2002) afirmaram que apesar de diferenças no nível de ploidia, tamanho do genoma e número de cromossomos,

as gramíneas apresentam alta colinearidade dos marcadores genéticos e genes. Guimarães et al. (1997) fazendo mapeamento comparativo de *Saccharum officinarum* e *S. robustum* por RFLP e analisando mapas genéticos de sorgo, não observaram diferenças nas ordens dos locos nos grupos de ligação entre estas três espécies. Ming et al. (1998) alinharam os genomas de três espécies de cana-de-açúcar e de sorgo e observaram que cerca de 80% dos locos mapeados eram homólogos entre as espécies, indicando que o pequeno genoma de sorgo pode ser usado como guia para o mapeamento molecular e a clonagem posicional em cana.

Portanto, o entendimento da genômica da cana-de-açúcar pode beneficiar programas genômicos de outros cereais, especialmente arroz, sorgo e milho (Grivet & Arruda, 2001), assim como informações sobre uma destas três espécies podem contribuir para o conhecimento dos processos relacionados em cana-de-açúcar.

2.1.2 Importância econômica

O agronegócio é responsável por 20,6% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro e gera 14% dos empregos totais do país. A cultura da cana-de-açúcar cresceu muito desde que foi introduzida no Brasil durante o período colonial, ocupando atualmente uma área de 6 milhões de hectares e reunindo 6% dos empregos agroindustriais do país. No Estado de São Paulo, o setor sucroalcooleiro é responsável por 35% do PIB e do emprego rural (União da Agroindústria Canavieira de São Paulo – UNICA, 2007). No Brasil, a atividade canavieira gera cerca de um milhão de empregos diretos, 511 mil na

produção da cana-de-açúcar e o restante na agroindústria de açúcar e álcool. Somente no Estado de São Paulo são cerca de 400 mil empregos diretos e 1,2 milhão de empregos indiretos (UNICA, 2007).

Na safra 2005/06 o Brasil colheu mais de 380 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (UNICA, 2007) sendo o maior produtor mundial, e a expectativa é que a safra 2006/07 tenha um aumento de 12% (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2007). A região centro-sul do país concentra a maior parte da produção, sendo somente o Estado de São Paulo o responsável por mais de 60% da safra nacional (Agrianual, 2006).

A cana-de-açúcar tem sido cultivada em muitos países principalmente para produção de açúcar e álcool. No Brasil foram produzidos aproximadamente 26 milhões de toneladas de açúcar e 16 milhões de metros cúbicos de álcool anidro na safra 2005/06 (UNICA, 2007). Estima-se que a demanda por álcool combustível aumente muito nos próximos anos, impulsionada principalmente pela substituição dos combustíveis fósseis por fontes de energia renováveis (Agrianual, 2006). A partir da cana-de-açúcar também é possível fabricar bebidas (cachaça, rum e vodka), ração animal, papéis e fármacos (a partir do bagaço), polietileno, estireno, cetona, acetaldeído, poliestireno, ácido acético, éter e acetona (a partir do etanol), fertilizantes (a partir da vinhaça e do vinhoto) e toda a gama de produtos que se extrai do petróleo (UNICA, 2007). A cana-de-açúcar gera, portanto, muitos produtos, assim como o petróleo, mas com um grande diferencial, são biodegradáveis e não ofensivos ao meio ambiente.

O bagaço da cana-de-açúcar também tem sido testado com sucesso para uso como substrato na cultura do tomate (Fernandes et al., 2006) e como suporte

alternativo para micropropagação da macieira, morangueiro e cafeeiro (Mohan, 2005), mas sua principal finalidade tem sido a geração de energia. O vapor, obtido pela queima do bagaço da cana, movimentava turbinas gerando energia elétrica, tornando as unidades industriais auto-suficientes e gerando renda extra, uma vez que o excedente é vendido às concessionárias de energia elétrica. Rípoli et al. (2000), utilizando dados da safra 1994/05, já estimavam que cerca de 5,5 milhões de pessoas poderiam ser atendidas se todo bagaço de cana-de-açúcar fosse utilizado para produção de energia elétrica e outros 7 milhões poderiam ser beneficiados se fossem aproveitados também folhas verdes, palha e ponteiros. Atualmente, as usinas do país comercializam 1600 MW (megawatts), quantidade capaz de abastecer uma cidade com mais de três milhões de habitantes, e a perspectiva é que até 2012/13 a energia excedente chegue a 8700 MW (ÚNICA, 2007).

A cultura da cana-de-açúcar também tem vantagens significativas como biofábrica, ou seja, como produtora de proteínas heterólogas inseridas por engenharia genética: é propagada vegetativamente, conferindo contenção superior do transgene se comparado com plantas sexualmente propagadas (Petrasovits et al., 2007); os cultivares comerciais normalmente não florescem no campo, existindo, portanto poucas chances do pólen se espalhar ou de serem produzidas sementes viáveis (ainda assim estas não são colhidas, plantadas ou comercializadas); a sucrose, extraída da cana, é vendida como cristal refinado que é essencialmente livre de proteína, portanto, se uma variedade de cana capaz de produzir um fármaco fosse usada para extração da sucrose, o produto final não seria contaminado (Wang et al., 2005). Como exemplo pode-se citar a produção do fator GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) humano em cana-de-açúcar por Wang et al. (2005). Esta proteína é importante no tratamento de anemia aplástica, neutropenia e de pacientes que passaram por transplante de medula óssea. Os autores não

observaram diferenças de atividade entre a proteína comercialmente purificada e a produzida em cana. No entanto, os níveis máximos de expressão obtidos foram baixos (0,02% proteínas solúveis) sendo necessário aumento da expressão para produção em larga escala.

Dada sua grande importância para a economia brasileira, a pesquisa em cana-de-açúcar tem recebido grandes investimentos, como, por exemplo, o projeto de seqüências expressas (SUCEST), no qual foram identificados aproximadamente 40.000 genes de cana-de-açúcar (Vettore et al., 2001), dos quais muitos tiveram suas prováveis funções determinadas e podem estar relacionados à expressão de características de grande interesse agrônômico, e outros, apesar de ainda não terem sido caracterizados, também podem auxiliar no melhoramento genético da cana-de-açúcar.

2.1.3 Aumento da demanda na produção de álcool

A gravidade das mudanças climáticas que vêm ocorrendo em nosso planeta, causadas, principalmente, pelo aquecimento global, fez com que em 1997, durante a Convenção das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas, representantes de diversos países assinassem o Protocolo de Kyoto (Convenção das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas, 2007), um tratado pela limitação e redução na emissão dos gases do efeito estufa, responsáveis pelo aquecimento global, e com o propósito de promover o desenvolvimento sustentável.

Uma das formas mais eficientes de se alcançar o desenvolvimento sustentável é pelo uso de energias renováveis, garantindo segurança no fornecimento de

energia e reduzindo a dependência da importação de petróleo. Além disso, energias renováveis são menos poluentes que combustíveis fósseis em termos de emissão local (como partículas, enxofre e chumbo) e gases do efeito estufa (dióxido de carbono e metano) que causam aquecimento global (Goldemberg, 2007).

O melhor exemplo de crescimento pelo uso de energia renovável, entre os países em desenvolvimento, é dado pelo Brasil com o programa de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar (Goldemberg, 2007), o PROÁLCOOL (Programa Nacional do Álcool – Decreto nº 76.593, de 14/11/1975). O PROÁLCOOL foi criado visando reduzir a forte dependência de petróleo importado no país, estabelecendo a mistura de 25% de álcool anidro à gasolina e incentivando a produção de automóveis movidos a álcool hidratado.

Macedo et al. (2004) demonstraram que a quantidade de energia gerada por uma tonelada de cana-de-açúcar na forma de álcool e energia elétrica é oito vezes maior que a quantidade de energia dispensada na sua produção, incluindo mão-de-obra, fertilizantes e máquinas. Além disso, os autores estimam que o equivalente a 1,97 quilograma de monóxido de carbono deixaria de ser emitido para cada litro de álcool hidratado que substituísse a gasolina como combustível.

Atualmente, segundo dados da ORPLANA (Organização dos Plantadores de Cana da Região Centro-Sul do Brasil, 2007) no Brasil cerca de 15 milhões de veículos são abastecidos com uma mistura de álcool anidro e gasolina enquanto que 1,7 milhão de veículos são abastecidos com álcool hidratado. Os veículos *flex-fuel*, aqueles que aceitam álcool, gasolina ou qualquer mistura intermediária, permitindo que o dono decida qual combustível utilizar em função dos preços praticados, já representam 77% das vendas de automóveis no país e atingiram 3,3 milhões de unidades vendidas este ano (Associação

Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores – ANFAVEA, 2007). Para abastecer esta frota automotiva já seriam necessários cerca de 10 mil metros cúbicos de álcool anidro e hidratado por ano (ORPLANA, 2007) e a expectativa do setor automobilístico é que a venda de carros *flex-fuel* aumente, mantendo a tendência de maior participação dos modelos bicombustível nas vendas totais de veículos (ANFAVEA, 2007), aumentando também a demanda por álcool. Este extenso uso do álcool no Brasil coloca o país como líder na redução da emissão de carbono e na redução do efeito estufa (Macedo et al., 2004).

A utilização de álcool misturado ao diesel, produzindo o combustível chamado e-diesel, encontra-se em fase de pesquisa em muitos países, inclusive no Brasil. Além de reduzir o consumo de petróleo, esta mistura traz resultados positivos para o meio ambiente (UNICA, 2007). O e-diesel está sendo testado em caminhões, ônibus e máquinas agrícolas, com 7,7 a 15% de álcool e até 5% de aditivos que previnem que o álcool se separe do diesel. Há um pequeno acréscimo nos custos, pelo menor rendimento deste combustível, porém já foram comprovadas muitas vantagens ambientais, como a redução entre 20 e 27% na emissão de monóxido de carbono e entre 27 e 41% na emissão de partículas (Departamento de Energia, Estados Unidos, 2007).

O elevado preço do petróleo em decorrência da redução das reservas mundiais, a busca por formas renováveis de energia por causa do efeito estufa e o forte crescimento econômico da Ásia, justificam a grande expectativa de crescimento no setor sucroalcooleiro. O Instituto FNP prevê aumento de 100% na produção de cana-de-açúcar para a safra 2014/15 (atingindo 760 milhões de toneladas) e aumento de 70% da área plantada neste período. O aumento da produtividade e do teor de sucrose deve responder pela diferença na produtividade esperada (Agrianual, 2006).

2.1.4 Estresses que afetam a cultura

Estresses bióticos

A cultura da cana-de-açúcar pode ser afetada por muitas doenças e pragas, endêmicas ou amplamente distribuídas. Entre as pragas, a principal é a broca (*Diatraea saccharalis*), comum em todas as regiões de cultivo. As larvas danificam a cana-de-açúcar perfurando o colmo onde empupam e os adultos emergem (White et al., 2001).

O controle da broca tem sido realizado através de inimigos naturais (Botelho et al., 1999; Pinto et al., 2003; Rosas-García et al., 2004; Rosas-García, 2006), pela obtenção de genótipos mais resistentes (White et al., 2001) e pela produção de linhagens de cana-de-açúcar resistentes geneticamente modificadas (Arencibia et al., 1997; Falco & Silva Filho 2003). Nestes trabalhos de aumento da resistência a *Diatraea* através da introdução de genes foram utilizados os promotores dos genes 35S, do vírus do mosaico da couve flor (CaMV), e ubiquitina de milho (*Ubi-1*) que promovem a expressão do transgene por toda planta. Pompermayer (2004) descreveu um promotor induzido por herbivoria em cana-de-açúcar, demonstrando ser possível obter plantas que expressem genes com ação inseticidas somente durante o ataque da lagarta.

A cigarrinha-da-raiz (*Mahanarva fimbriolata*) é outro destaque entre as pragas da cana-de-açúcar. O corte mecanizado e a proibição da queima da palhada favorecem o acúmulo de material orgânico no solo, criando condições ideais de temperatura e umidade para a reprodução da praga (Loureiro et al., 2005). Durante a alimentação da cigarrinha, o adulto injeta toxinas que causam redução no tamanho e

grossura dos entrenós (Batista Filho et al., 2003). Inseticidas têm sido testados para o controle desta espécie em diferentes doses e em diferentes épocas do ano (Dinardo-Miranda et al., 2002; Dinardo-Miranda et al., 2004). O controle biológico através do fungo *Metarhizium anisopliae* também tem sido testado com resultados satisfatórios (Batista Filho et al., 2003; Loureiro et al., 2005).

Estudos têm demonstrado os grandes prejuízos causados por nematóides à cana-de-açúcar, danificando seu sistema radicular, comprometendo a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, o desenvolvimento da planta (Bond et al., 2004; Bond et al., 2004a). Nematicidas químicos e naturais têm sido testados sem resultados significativos para várias espécies de parasitas (Barros et al., 2002; Chaves et al., 2003; Dinardo-Miranda et al., 2002; Rosa et al., 2004; Oliveira et al., 2005). Incorporação de matéria orgânica ao solo e rotação de cultura com plantas não hospedeiras também são utilizadas no combate aos nematóides (Oliveira et al., 2005), pois além de melhorarem as características do solo, inibem a proliferação destes parasitos, diminuindo a infestação. As espécies *Cajanus cajan* (guandu anão 'Iapar 43'), *Crotalaria breviflora* e *Crotalaria spectabilis* foram resistentes a *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus* em estudo realizado por Inomoto et al. (2006), demonstrando seu potencial como matéria orgânica ou adubo verde para áreas infestadas por estes nematóides.

Com relação às doenças da cultura da cana-de-açúcar, as mais importantes no mundo são quatro: carvão, raquitismo das soqueiras, escaldadura das folhas e mosaico da cana-de-açúcar (Santos, 2003) e a melhor forma de combater essas doenças é o cultivo de variedades resistentes, desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético, uma vez que o diagnóstico e a erradicação são muito difíceis, principalmente no caso do raquitismo e da escaldadura que são de origem bacteriana.

No Brasil, Santos (2003) destaca que as doenças fúngicas que trazem maior preocupação e prejuízos ao setor canavieiro são: a ferrugem, que é causada pelo fungo *Puccinia melanocephala*, que está disseminado por todo Brasil e em outros 64 países produtores e, o carvão da cana-de-açúcar, cujo agente causador é *Ustilago scitaminea*, que ocorre de forma generalizada pelo Brasil e causa tanto redução da produção como perda de qualidade do caldo. Os programas de melhoramento têm selecionado variedades para resistência a estas doenças, como descrito por Ido et al. (2006) para ferrugem. Outra forma de controle é a utilização de fungicidas, como descrito por Wada (2003) para o carvão, mas esta alternativa é economicamente inviável em grandes plantações.

Santos (2003) também aponta as principais doenças bacterianas de cana-de-açúcar no Brasil: a escaldadura das folhas e o raquitismo das soqueiras. O raquitismo das soqueiras é causado pela *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, antes chamada de *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, que pode causar prejuízos de até 30% da produtividade. A escaldadura das folhas é provocada pela bactéria *Xanthomonas albilineans*, que causa má formação dos toletes, morte das touceiras, queda na produção e no teor de sacarose. Para estas doenças é recomendada a utilização de variedades resistentes, pelo difícil diagnóstico e facilidade de dispersão através de ferramentas contaminadas utilizadas para a colheita.

Estresses abióticos

Estresses abióticos são condições ambientais adversas que podem afetar um organismo alterando seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento, eles podem ser causados por falta de água como consequência de seca, alta salinidade ou frio, por excesso de monóxido de carbono ou ozônio atmosférico, alteração na intensidade luminosa e calor, mas o estresse hídrico é o principal, pois afeta quase todas as funções e a produtividade das plantas importantes agronomicamente.

As respostas das plantas ao estresse são em níveis fisiológico e bioquímico, através de alteração da fluidez das membranas e sua composição e da concentração de solutos, perda de turgor e interações proteína-proteína e proteína-lipídio (Valliyodan & Nguyen, 2006) assim como, em níveis molecular e celular, envolvendo a expressão de uma variedade de genes estresse-induzidos (Yamaguchi-Shinozaki et al., 2002). Em *Arabidopsis* e em arroz, estes produtos gênicos foram classificados em dois grupos: (1) proteínas com papel na tolerância ao estresse, tais como proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*), proteases, enzimas detoxificadoras, transportadores de açúcar, entre outras; (2) proteínas envolvidas na regulação da transdução de sinal e da expressão gênica em resposta ao estresse, tais como: quinases, fatores de transcrição e enzimas do metabolismo de fosfolipídios (Yamaguchi-Shinozaki et al., 2002; Rabbani et al., 2003).

Condições de seca desencadeiam a produção do ácido abscísico (ABA), que causa fechamento dos estômatos e induz a expressão de genes relacionados ao estresse. Muitos genes são induzidos por tratamento com ABA exógeno, enquanto outros não. Isto sugere a existência de vias de sinalização de estresse ABA dependente e ABA

independente. Segundo Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki (2007), a hipótese é que existam seis vias de transdução de sinal para a ativação dos genes induzidos por seca, alta salinidade e frio, sendo três dependentes de ABA e três independentes (Figura 1). Nas vias dependentes de ABA, ABRE (*ABA-responsive element*) é o principal elemento em resposta ao ABA e os fatores de transcrição envolvidos nesta via são os AREB/ABFs (*ABRE-binding protein/ABRE-binding factor*). MYB2 e MYC2 e NAC são outros fatores que também atuam na expressão gênica induzida por ABA, também são sensíveis ao ácido jasmônico (JA) e podem estar relacionados à resposta a estresses bióticos. Enquanto nas vias independentes de ABA, DRE (*dehydration-responsive element*) é o principal elemento envolvido na regulação de genes induzidos por seca, salinidade e frio. Os fatores DREB1/CBFs (*DRE-binding protein/C-repeat-binding factor*) estão envolvidos na expressão gênica em resposta ao frio e os DREB2s na resposta a desidratação e alta salinidade. A terceira via independente de ABA é controlada por seca e salinidade, mas não por frio e envolve os fatores de transcrição NAC e HD-ZIP (*homeodomain Leu zipper*).

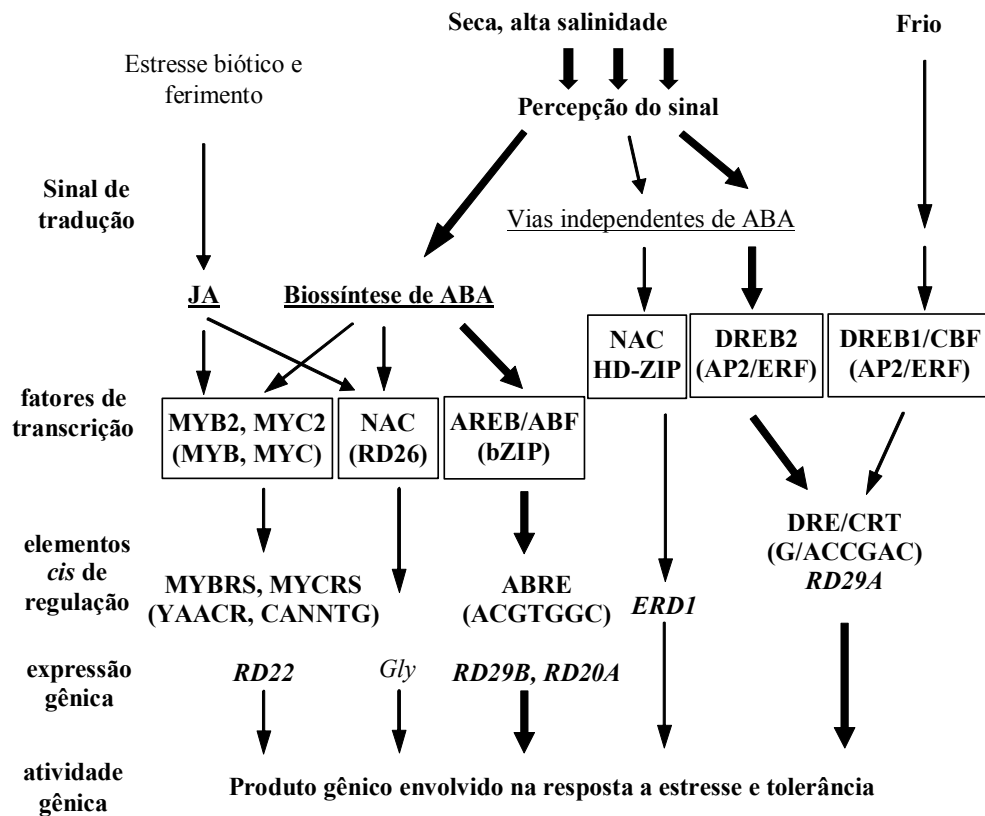


Figura 1 – Vias de transdução de sinal ABA dependentes e independentes. ABRE é o principal elemento em resposta a ABA e os fatores de transcrição desta via são os AREB/ABFs. MYB2 e MYC2 e NAC também são induzidos por ABA, sensíveis ao JA e podem estar relacionados à resposta a estresses bióticos. DRE é o principal elemento das vias independentes de ABA, os fatores DREB1/CBFs estão envolvidos na resposta ao frio, DREB2s na resposta a desidratação e alta salinidade e NAC e HD-ZIP à seca e salinidade, mas não ao frio. (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Muitos genes reguladores chave, capazes de controlar um subgrupo de genes, fatores de transcrição e sinalizadores celulares envolvidos na tolerância à seca em plantas já foram descritos e seu uso pode ser interessante no melhoramento de várias espécies via engenharia genética já que eles podem regular a expressão de muitos genes (Umezawa et al., 2006). A seguir são citados alguns exemplos deste uso.

Shou et al. (2004) aumentaram a tolerância a seca em milho produzindo plantas geneticamente modificadas capazes de expressar um domínio quinase do gene

mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) de tabaco (NPK1) sob controle do promotor CaMV 35S. NPK1 pode induzir a expressão de *heat shock proteins* (HSPs) e *glutathione-S-transferases* (GSTs), que reduzem os danos e protegem as plantas de estresses ambientais.

Introduzindo o gene da *trehalose synthase* de *Grifola frondosa* (*TSase*) sob controle de duas cópias do promotor CaMV 35S, Zhang et al. (2006) produziram plantas de cana-de-açúcar mais tolerantes à seca. A quantidade de trealose acumulada nas folhas destas plantas foi considerada alta pelos autores e não foi observada alteração morfológica ou inibição do crescimento. A trealose é importante para bactérias, leveduras e invertebrados, pois estabiliza proteínas e membranas lipídicas e protege estruturas biológicas de danos causados pela dessecação.

Chen et al. (2007) superexpressaram um trocador Na^+/H^+ , que atua contra o fluxo de Na^+ no vacúolo celular, inserindo uma cópia extra deste gene em uma cultivar elite de arroz, e obtiveram linhagens com maior tolerância a alta salinidade e com melhor desempenho na recuperação após o estresse.

Genes ortólogos de DREB1/CBF tem sido isolados em muitas espécies, tais como: arroz, nabo, milho, sorgo e trigo (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). A superexpressão de OsDREB1A (Dubouzet et al., 2003) e ZmDREB1A (Qin et al., 2004) em *Arabidopsis* resultou em aumento da tolerância a seca, alta salinidade e congelamento, e seca e congelamento, respectivamente. Estes resultados indicam que sistemas regulatórios similares foram conservados em mono e dicotiledôneas, sugerindo que DRE/DREB pode ser utilizado para o aumento da tolerância de muitas espécies a seca, alta salinidade e frio através da engenharia genética (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki,

2006).

2.2 Melhoramento genético

2.2.1 Melhoramento clássico

O melhoramento de espécies surgiu com a domesticação, já que este é o resultado de um processo de seleção que levou plantas e animais a uma maior adaptação ao cultivo ou criação e utilização pelo homem (Gepts, 2004). A domesticação das plantas e dos animais silvestres que o homem primitivo utilizava para se alimentar criou a agricultura e transformou radicalmente a sociedade humana (Prakash, 2001).

Ao redor de todo mundo são pouco mais de 100 as espécies cultivadas atualmente e somente algumas delas nos fornecem quase todo alimento. Por um processo gradual de seleção, nossos ancestrais escolheram poucas plantas silvestres e as transformaram em espécies cultivadas (Prakash, 2001).

As plantas têm sido continuamente alteradas e selecionadas para as mais diversas características: arquitetura, tempo de desenvolvimento, resistência a doenças e pragas, desenvolvimento de frutos, tolerância a estresses ambientais, sabor, nutrição, entre outros (Prakash, 2001). Em geral, as técnicas utilizadas envolvem cruzamentos naturais, quando existe possibilidade de reprodução sexuada entre o cultivar elite e o doador da característica desejada, cruzamentos artificiais ou hibridações e o uso de colchicina, um inibidor da divisão celular, quando a reprodução sexuada não é possível, e o uso de radiação ionizante, substâncias mutagênicas e variação somaclonal quando a característica

desejada não existe (Prakash, 2001). Mais de 2200 variedades de espécies vegetais comercializadas sofreram alguma mutação induzida por radiação durante seu melhoramento (Bradford et al., 2005). Em todos estes casos, a seleção das linhagens que continham a característica desejada, era feita com base, quase total, em características fenotípicas, sem conhecimento das mudanças genotípicas que causaram o fenótipo (Bradford et al., 2005).

Atualmente, métodos moleculares têm sido utilizados para assistir os programas de melhoramento principalmente na avaliação das linhagens durante seu processo de seleção, a fim de diminuir o tempo e os custos necessários para obtenção de um cultivar melhorado. Ishitani et al. (2004) sintetizam o trabalho do programa de melhoramento de feijão e *Brachiaria* do CIAT (Centro Internacional para Agricultura Tropical), como um exemplo da integração entre o melhoramento clássico e as novas ferramentas moleculares. Para o feijão foram obtidas variedades mais tolerantes à seca por melhoramento tradicional e genes relacionados a esta característica, já descritos em literatura, têm sido estudados atualmente, como por exemplo, os genes *DREB*. Para a *Brachiaria*, o melhoramento desenvolveu algumas variedades resistentes a percevejos e outras tolerantes ao alumínio e à deficiência nutricional, sendo que através de mapeamento, a associação destas duas características tem sido estudada. Além disso, novos marcadores para tolerância ao alumínio estão sendo desenvolvidos para a *Brachiaria* a partir de genes diferencialmente expressos em variedades tolerantes e sensíveis a este estresse.

No caso da cana-de-açúcar, além da domesticação, em 1888 teve início um programa de melhoramento que visava incorporar a resistência a doenças, robustez e capacidade de brotamento de *S. spontaneum* ao germoplasma da espécie cultivada *S.*

officinarum. Em 1921 os primeiros cultivares híbridos foram lançados (POJ 2725 e POJ 2878) e a partir destes, todos os cultivares modernos de cana-de-açúcar teriam sido desenvolvidos (Moore, 2005).

Para o melhoramento de cana-de-açúcar, a possibilidade do uso de marcadores para estudo de poliplóides sem o conhecimento do tipo e nível de ploidia marcou o início de uma nova era. Atualmente, recursos genômicos abundantes foram estabelecidos, o número básico de cromossomos foi resolvido (D'Hont et al., 1998), o conhecimento sobre a diversidade genética e a estrutura do genoma está significativamente avançado e mapas de ligação têm sido construídos (Al-Janabi et al., 1993; Ming et al., 1998; Ming et al., 2002; Moore, 2005). Todo esse conhecimento deve auxiliar os pesquisadores na identificação e seleção de genótipos nos programas de melhoramento. Através do melhoramento clássico também foram selecionados genótipos mais resistentes à broca *Diatraea saccharalis* (White et al., 2001; Milligan et al., 2003).

As conquistas obtidas pelo melhoramento clássico são importantes, mas tem ficado cada vez mais evidente que somente uma abordagem integrada combinando as estratégias de melhoramento clássico e molecular pode permitir à agricultura e à indústria açucareira, em particular, encarar os atuais desafios e atender a crescente demanda mundial por seus derivados (Lakshmanan et al., 2005). Além disso, no caso da cana-de-açúcar, a alta ploidia, baixa fertilidade, genoma grande e interações ambientais complexas fazem do melhoramento convencional um trabalho árduo (Zhang et al., 2006).

2.2.2 Engenharia genética

Apesar das pesquisas biotecnológicas em cana-de-açúcar terem começado por volta de 1960, com pesquisas de regeneração de plantas *in vitro*, abordagens moleculares visando o melhoramento de cana-de-açúcar só começaram na década passada. Segundo Lakshmanan et al. (2005), a primeira conquista para o desenvolvimento de um sistema de melhoramento molecular/convencional integrado para cana foi o estabelecimento de um sistema de transformação eficiente por Bower & Birch em 1992.

A produção de plantas geneticamente modificadas é uma importante estratégia para o melhoramento vegetal uma vez que permite o melhoramento de genótipos pela introdução de um ou poucos genes, que em muitos casos são encontrados em espécies distantes e que não poderiam ser transferidos via recombinação, o que requer indivíduos sexualmente compatíveis. As características melhoradas são muitas, indo desde o aumento de resistência a estresses bióticos (Kazan et al., 1998; Kanzaki et al., 2002; Bi et al., 2006; Meiyalaghan et al., 2006; Mackintosh et al., 2007) e abióticos (Shen et al., 2002; Oh et al., 2005; Chen et al., 2007a; Lim et al., 2007; Tang et al., 2007) até o uso das plantas como biorreatores (Börnke et al., 2002; Zhang & Frankenberger, 2003; Xu et al., 2005; Obregon et al., 2006; Tavva et al., 2007). Cabe ressaltar que em sua maioria, tais estudos foram realizados utilizando cassetes formados por genes e promotores provenientes de outras espécies.

Em cana-de-açúcar também têm sido realizados diversos trabalhos empregando transformação e regeneração (Arencibia et al., 1997; Elliott et al., 1998; Enriquez-Obregon et al., 1998; Falco et al., 2000; Falco & Silva Filho, 2003; Leibbrandt & Snyman, 2003; Wei et al., 2003; Gilbert et al., 2005; Vickers et al., 2005; Zhang et al., 2006; Chong et al., 2007; Petrasovits et al., 2007; Wu & Birch, 2007). Nestes trabalhos também foram utilizados genes e seqüências regulatórias isoladas de outras espécies, principalmente porque ainda não existem tantos genes e promotores caracterizados em cana-de-açúcar quanto em outras espécies como *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*.

Arencibia et al. (1997) introduziram parte do gene *cryIA(b)* de *Bacillus thuringiensis* (BT) sob controle do promotor CaMV 35S em cana-de-açúcar e observaram seu efeito larvicida, protegendo as plantas dos ataques de *Diatraea saccharalis*. Falco & Silva Filho (2003) transformaram cana-de-açúcar inserindo independentemente o cDNA de dois inibidores de proteinase de soja (*Kunitz trypsin* e *Bowman-Birk*) sob controle do promotor *Ubi-1* e observaram, nos dois casos, retardo significativo no crescimento de larvas de *Diatraea* alimentadas com colmos de cana transgênica, porém não impedindo a infestação.

Para produção de linhagens de cana-de-açúcar resistentes a herbicidas, Enriquez-Obregon et al. (1998) introduziram o gene *bar* (*phosphinothricin acetyltransferase*) sob controle do promotor *Ubi-1* e do primeiro exon-intron não traduzido do gene *ubil* em meristemas de cana utilizando infecção por *Agrobacterium tumefaciens*, obtendo plantas altamente resistentes ao agrotóxico. Utilizando biobalística, Falco et al. (2000) também produziram plantas de cana-de-açúcar transformadas com o gene *bar* sob controle do promotor *Ubi-1* e conseqüentemente resistentes ao herbicida. Apesar das

linhagens transformadas por biobalística terem apresentado um número maior de cópias do gene *bar* (entre duas e cinco) do que aquelas obtidas por infecção por *Agrobacterium* (uma ou duas), esta diferença parece não ter influenciado o desenvolvimento das plantas, já que nenhuma alteração foi descrita pelos autores.

A cor do suco e do açúcar bruto, em cana-de-açúcar, está relacionada à atividade da enzima *polyphenol oxidase* (PPO), que atua sobre compostos fenólicos produzindo polímeros escuros quando a cana é esmagada. Vickers et al. (2005) tentaram diminuir a atividade de PPO inserindo cópias do gene nativo em cana-de-açúcar nos sentidos *sense* e *antisense* (original de leitura e invertido), mas o resultado foram plantas com níveis maiores de transcritos e atividade de PPO, e conseqüentemente, com suco e açúcar mais escuros, para as duas construções.

A cana-de-açúcar é uma espécie muito eficiente na produção de biomassa, armazenando grande parte da sua energia no colmo na forma de sucrose e esta característica a torna um candidato a biofábrica muito interessante. Pensando nisso, Chong et al. (2007) a testaram na produção de sorbitol, um tipo de açúcar não calórico que também é utilizado na produção de ácido ascórbico, através da introdução do gene *sorbitol-6-phosphate dehydrogenase* de *Malus domestica* (*mds6pdh*) sob controle do promotor *Ubi-1*. As linhagens obtidas apresentaram acúmulo de sorbitol, porém este acúmulo afetou o crescimento e o metabolismo da cana-de-açúcar. Um outro tipo de açúcar foi produzido em linhagens de cana-de-açúcar expressando o gene que codifica a *sucrose isomerase* (UQ68J) de *Pantoea dispersa* sob controle do promotor *Ubi-1* sem diminuição na quantidade de sucrose armazenada e sem prejuízos fenotípicos à planta (Wu & Birch, 2007). A enzima *sucrose isomerase* converte sucrose em isomaltulose, que é um açúcar acariogênico, de digestão lenta e não higroscópio, além de ser de interesse para a indústria

de biomateriais.

2.3 Regulação da expressão gênica

Os projetos de seqüenciamento como o SUCEST têm sido de extrema importância para a identificação e isolamento de genes, entretanto, sabe-se que a simples caracterização de um gene não garante sua utilidade na obtenção de linhagens transgênicas da espécie de interesse. A meta nesses casos é garantir a expressão do gene de interesse num modelo temporal, espacial e na magnitude adequada com os objetivos pretendidos. Para tal, promotores com características específicas são necessários (Rance et al., 2002).

O promotor é o processador central da regulação da expressão de um gene uma vez que contém os sítios de ligação para as RNA polimerases, responsáveis pela transcrição gênica. A região promotora de um gene eucariótico, por definição, compreende a região 5' da seqüência transcrita, e contém em geral, uma seqüência conservada (T/A)A(A/T) a aproximadamente 30 pares de bases (pb) do ponto de início da transcrição, denominada *TATA Box*, e elementos promotores proximais localizados a aproximadamente 100 (*CCAAT Box*) e 200 pb (*GC Box*) acima do ponto de início da transcrição (Griffiths et al., 2000). Tais seqüências determinam o ponto correto do início e a taxa da transcrição, bem como o local e o momento em que este processo deverá ocorrer. Os mecanismos que proporcionam a modulação transcricional são extremamente complexos e ocorrem através de uma intrincada rede de interações envolvendo os elementos citados acima e outros elementos localizados mais distantes do ponto de início da transcrição (*enhancers* e *silencers*).

A região adjacente ao sítio de início de transcrição que abrange do nucleotídeo -250 ao +250, aproximadamente, é conhecida como promotor proximal (Butler & Kadonaga, 2002), enquanto a região mínima de sequência contínua de DNA necessária para dirigir corretamente o início da transcrição de um gene pela maquinaria de transcrição é chamada de promotor principal ou *core promoter*. Essa região mínima normalmente inclui o sítio de início de transcrição e 35 nucleotídeos acima e abaixo desse sítio (Butler & Kadonaga, 2002).

O elemento melhor caracterizado no *core promoter* é o *TATA Box*. Em promotores que possuem *TATA Box*, os fatores envolvidos na transcrição (*transcription factor* – TF) se agrupam no complexo de pré-iniciação da transcrição (*preinitiation complex* – PIC), na seguinte ordem: TFIID, TFIIB, RNA polimerase II-complexo TFIIF, TFIIE e depois TFIIH. O *TATA Box* é reconhecido pela proteína ligante de TATA (*TATA box-binding protein* – TBP), subunidade do fator de transcrição TFIID, enquanto TFIIB é um polipeptídeo único que interage com TBP assim como com o DNA a montante do *TATA box*. Portanto, parece que esses dois fatores têm um papel crítico no reconhecimento dos elementos do *core promoter* (Butler & Kadonaga, 2002).

Atualmente, os promotores mais comumente utilizados em plantas geneticamente modificadas são o promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV 35S), os promotores dos genes que codificam respectivamente a *nopalina sintetase* (NOS) e a *octopina sintetase* (OCS) de *Agrobacterium tumefaciens* e o promotor do gene de ubiquitina (*Ubi-1*) de milho. Apesar dos grandes avanços que têm sido obtidos com o uso desses promotores, os padrões de expressão dos transgenes são variados e baixos em alguns casos (Zheng & Murai, 1997; Green et al., 2002; Shou et al. 2004; Wu & Birch, 2007) não havendo garantia de expressão no tecido adequado (Neuteboom et al., 2002;

Petrasovits et al., 2007).

Além disso, o uso de promotores constitutivos como os citados acima, e ainda derivados de outras espécies que não as melhoradas, tem sido alvo de contestação, sobretudo do ponto de vista do consumo humano/animal e efeito no meio ambiente. Tentando minimizar esse problema, promotores constitutivos têm sido isolados e caracterizados em diferentes espécies tais como arroz (McElroy et al., 1990), cana-de-açúcar (Wei et al., 2003), maçã (Silfverberg-Dilworth et al., 2005), medicago (Xiao et al., 2005), milho (Christensen & Quail, 1996), entre outras.

Outro motivo de preocupação refere-se ao uso de promotores constitutivos, como o CaMV 35S, na regulação da expressão de genes utilizados para seleção de transformantes (genes de resistência a antibióticos, por exemplo) já que os mesmos determinam, em geral, a expressão do produto gênico em todos os tecidos da planta. Tal característica, desnecessária e indesejável em vegetais geneticamente modificados, tende a diminuir a aceitação dos produtos derivados pelos consumidores.

Em casos como esse e naqueles em que existe baixa aceitação do transgene, promotores tecido-específicos seriam de grande importância e estudos visando à identificação dos mesmos já vêm sendo conduzidos. Por exemplo, Huang et al. (2001) desenvolveram, a partir da identificação de um promotor capaz de regular a expressão especificamente em calos, um método de seleção de plantas transformadas de arroz que certamente não expressarão o gene de resistência ao antibiótico em outros tecidos. Luo et al. (2006) identificaram um gene de expressão específica em antera de arroz (RTS) e observaram que seu promotor era capaz de determinar o referido padrão de expressão em arroz e *Arabidopsis*. Os autores demonstraram que este promotor tem grande aplicação

biotecnológica, tanto por evitar a expressão ininterrupta do gene inserido, quanto por viabilizar a produção de plantas macho-estéreis, quando modula a expressão do gene *barnase* de *Bacillus amyloliquefaciens*, uma ribonuclease que compromete o desenvolvimento da célula em que está presente. Chen et al. (2007a) isolaram e caracterizaram o promotor do gene da subunidade menor da *AGPase* (*ADP-glucose pyrophosphorylase*) de endosperma de milho. Este promotor foi capaz de regular a expressão de maneira específica em sementes de tabaco, órgão interessante para utilização como biofábrica.

A expressão de proteínas tóxicas como as utilizadas para o controle de determinados insetos também é motivo de divergências em relação ao uso das plantas geneticamente modificadas. Tais proteínas são em determinados casos pouco específicas podendo agir em insetos não alvos, causando um desequilíbrio no meio ambiente. Esse efeito indesejado seria, sem dúvida, minimizado por meio do uso de promotores que respondessem a estímulos específicos como, por exemplo, ataque de insetos, limitando assim a expressão do transgene ao período de duração do estímulo. Promotores com tais características têm sido isolados (Sasaki et al., 2002; Song & Goodman, 2002; Wang et al., 2002), inclusive em cana-de-açúcar (Pompermayer, 2004).

O conhecimento de promotores também é importante porque é esperado que, ao menos em parte, os padrões similares de expressão de um grupo de genes sejam devido às semelhanças nas regiões envolvidas na regulação da transcrição (Ohler & Niemann, 2001). Desta maneira, a identificação única e exclusiva dos genes envolvidos em uma característica, como feito por *microarrays*, por exemplo, não permitirá o completo entendimento dos mecanismos de regulação dos genes envolvidos em uma dada característica.

Muito pouco se sabe sobre promotores tecido-específicos e induzidos em cana-de-açúcar. Promotores tecido-específicos fortes, particularmente àqueles capazes de promover a expressão em tecidos de colmo e raiz, e induzidos sob diferentes condições, seriam muito importantes para o melhoramento da cana-de-açúcar e para emprego da mesma como biofábrica (Lakshmanan et al., 2005).

2.4 Isolamento da região promotora

A identificação de regiões promotoras pode ser realizada por diferentes métodos. O ponto comum a esses métodos é a identificação de genes com expressão tecido-específica empregando-se técnicas para verificação de expressão diferencial, como por exemplo, através de *northern* eletrônico e *northern blot*. Na publicação do transcriptoma de cana-de-açúcar na revista *Genetics and Molecular Biology* em 2001, alguns autores identificaram por análise *in silico* genes com possível padrão de expressão tecido-específico (Drummond et al., 2001; Figueiredo et al., 2001) ou estímulo dependentes (Falco et al., 2001). Esses genes e respectivos ESTs representam um conjunto de potenciais candidatos a serem utilizados na identificação de seqüências genômicas contendo as suas respectivas regiões regulatórias. Essa identificação pode ser realizada a partir da triagem de uma biblioteca genômica ou utilizando-se estratégias de *genome walking* ou de *Thermal Asymmetric Interlaced – Polymerase Chain Reaction* (TAIL-PCR).

Devic et al. (1997) desenvolveram uma metodologia bastante eficiente para clonagem de promotores via *genome walking* que consiste dos seguintes passos: isolamento de DNA genômico; digestão separadamente com várias enzimas de restrição de

corte abrupto; ligação de adaptadores aos fragmentos de restrição resultantes; uso desses fragmentos+adaptadores como moldes para ampliações por PCR utilizando-se um oligonucleotídeo de seqüência complementar ao adaptador e um complementar a um dado gene, cuja expressão tecido-específica e seqüência de bases tinham sido previamente verificadas; seguindo-se da clonagem e seqüenciamento dos fragmentos.

Liu & Whittier (1995) descreveram uma metodologia de isolamento de regiões a montante de seqüências conhecidas baseada apenas na amplificação por PCR, denominada TAIL-PCR. Segundo os autores, trata-se de uma metodologia muito mais simples e rápida que a de *genome walking*. Esta técnica utiliza um oligonucleotídeo que se anela na região inicial da seqüência em questão e um oligonucleotídeo randômico ou degenerado que se anela a montante, permitindo a amplificação de vários fragmentos e entre eles alguns ligados à seqüência de interesse. Estes fragmentos de interesse seriam re-amplificados por mais duas reações seletivas realizadas em seguida empregando o produto diluído de reação, o oligonucleotídeo randômico e dois outros oligonucleotídeos gene-específicos mais internos. A eletroforese de todos estes produtos num mesmo gel possibilitaria a identificação de fragmentos que teriam tido seu tamanho reduzido com as sucessivas ampliações. Terauchi & Kahl (2000) aperfeiçoaram a técnica descrita acima de modo a utilizar três oligonucleotídeos gene-específicos posicionados consecutivamente para a terceira reação de amplificação, possibilitando maior seletividade e eletroforese apenas dos produtos da terceira reação.

2.5 A busca por promotores: propriedade intelectual e patentes

O conhecimento científico disponível atualmente torna viável a geração de plantas geneticamente modificadas melhor adaptadas às mais diversas condições. Porém, como já foi mencionado, para a produção de plantas transgênicas com tais características é necessário, além da seqüência que codifica a proteína a ser expressa, uma seqüência promotora que module a expressão do transgene inserido. A indisponibilidade de promotores que atuem de maneira adequada em determinadas espécies e em determinadas situações constitui uma barreira para o melhoramento de muitas espécies de interesse através da biotecnologia.

Existem poucos promotores caracterizados em cana-de-açúcar, e mesmo em monocotiledôneas esse número é reduzido. Em uma rápida busca no banco de patentes *Patent Lens* (<http://www.patentlens.net>, acesso em 03/07/07) foi possível verificar que o número de patentes registradas é pequeno (Tabela 1). Da mesma maneira, em uma busca não exaustiva também foram encontrados na literatura poucos trabalhos descrevendo o isolamento e a caracterização de promotores em espécies monocotiledôneas (Tabela 2). Para cana-de-açúcar, os poucos promotores encontrados estão protegidos por patentes, o que faz com que seja necessária a autorização dos respectivos autores para o uso das seqüências. Vale ressaltar que existem muitos trabalhos que caracterizam promotores em semente que não foram considerados nesta busca por este não ser alvo de interesse para o melhoramento de cana-de-açúcar.

Essa escassez de seqüências regulatórias de uso público para monocotiledôneas, especialmente cana-de-açúcar, e principalmente de promotores que dirijam a expressão de maneira específica em determinado órgão/tecido, ou situação, faz

com o isolamento e a caracterização de promotores seja de vital importância para o melhoramento genético via transgenia dessa e de muitas outras espécies.

Tabela 1 – Registros de patentes para seqüências promotoras de monocotiledôneas encontrados no banco *Patent Lens*.

Patente	Espécie	Padrão de Expressão	Referência
US 6706948	Cana-de-açúcar	Todos os tecidos	Wei et al. (2003)
US 6638766	Cana-de-açúcar	Todos os tecidos	Wei et al. (2003)
US 7141427	Cana-de-açúcar	Todos os tecidos	-
US 2007/16979	Cana-de-açúcar	Entrenó, patógeno induzido	-
US 6958434	Arroz	Todos os tecidos	Jang et al. (2002)
US 5639948	Arroz	Estate	-
US 5614399	Milho	Todos os tecidos	Christensen & Quail (1996)
US 6359196	Sorgo	Semente/Germinação	-
US 5459252	Tabaco	Raiz	Yamamoto et al. (1991)
US 5866793	Trigo	Todos os tecidos	-
US 6627793	Trigo	Induzido por frio	-

Tabela 2 – Seqüências promotoras caracterizadas para espécies da família Poaceae.

Espécie	Padrão de Expressão	Referência
Cana-de-açúcar	Induzido por herbivoria	Pompermayer (2004)
Arroz	Todos os tecidos	McElroy et al. (1990)
Arroz	Todos os tecidos	Sivamani & Qu (2006)
Arroz	Antera	Luo et al. (2006)
Arroz	Células da aleurona	Opsahl-Sorteberg et al. (2004)
Arroz	Semente	Qu & Takaiwa (2004)
Brassica	Todos os tecidos	Gittins et al. (2001)
Cevada	Embriões e coleóptilos	Federico et al. (2005)
Cevada	Induzido por frio	Dunn et al. (1998)
Milho	Endosperma	Chen et al. (2007a)
Milho	Semente	Belanger & Kriz (1989)
Sorgo	Raiz e folha	Schünmann et al. (2004)
Trigo	Deficiência de fósforo	Tittarelli et al. (2007)



3. Objetivos

✓ Identificar e caracterizar genes com padrão de expressão órgão/tecido-específico utilizando para tal as informações geradas no projeto de seqüências expressas (ESTs) da cana-de-açúcar (SUCEST);

✓ Isolar e caracterizar as regiões promotoras de genes com expressão órgão/tecido-específica.



4. Material e Métodos

4.1 Identificação de *clusters* com padrão de expressão tecido-específico no banco do SUCEST

4.1.1 Seleção de *clusters*

Os *clusters* com padrão de expressão tecido-específico foram selecionados *in silico* a partir dos dados do banco de ESTs do SUCEST (<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br>). Este banco é composto por ESTs oriundos do seqüenciamento de bibliotecas de cDNA construídas a partir de mRNA extraído de vários tecidos em condições normais e sob estresses bióticos e abióticos (Vettore et al., 2001). A identificação dos ESTs foi feita comparando-se os *reads* presentes em biblioteca de um determinado tecido com os *reads* obtidos para os demais tecidos. Os *clusters* formados por *reads* provenientes unicamente de um determinado tecido ou órgão foram considerados tecido-específicos.

4.1.2 Análise das seqüências

Todos os *clusters* selecionados foram analisados quanto a sua similaridade no banco de dados *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando as seqüências dos *reads* que melhor os representavam, considerando a qualidade e extensão das seqüências. Esta análise foi realizada com auxílio da ferramenta *Blast* (Altschul et al., 1990) adotando como critério de seleção o valor de *E-value* menor ou igual a e^{-5} .

4.2 Confirmação da expressão tecido-específica dos candidatos por PCR

4.2.1 Desenho de oligonucleotídeos

Após a análise *in silico*, oligonucleotídeos para o *read* mais representativo dos *clusters* com padrão de expressão tecido-específico foram desenhados com o auxílio dos programas computacionais *Primer3* (Rozen & Skaletsky, 2000), *PrimerExpress*, que acompanha o aparelho *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*), e *GeneRunner* (*Hastings Software*), seguindo os critérios: mínimo de 16 pares de base, temperatura de anelamento maior que 55°C e conteúdo de GC variando entre 40 e 80%.

4.2.2 Extração de RNA total de diferentes órgãos/tecidos de cana-de-açúcar

O RNA total empregado na validação dos ESTs selecionados *in silico*, foi extraído dos seguintes órgãos/tecidos de cana-de-açúcar: entrenó 1, entrenó 4, entrenó maduro, folha enrolada, folha jovem, folha +1, bainha da folha, casca, raiz com 8 dias, raiz com 20 dias, raiz madura, flor e semente. Os tecidos foram gentilmente cedidos pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC – Piracicaba/SP). O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e submetido à extração do RNA conforme metodologia descrita por Korimbocus et al. (2002) (baseado em Chang et al., 1993) com as seguintes modificações:

1 – Tampão de extração: 2% CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide);

2% PVP (polyvinylpyrrolidone K40);

100 mM Tris-HCl pH 8,0;

25 mM EDTA;

2 M NaCl.

2 – Foram empregados 500 µl do tampão de extração (pré-aquecido a 65°C) para 100 mg de tecido vegetal macerado;

3 – Adição de um volume de cloreto de lítio 5 M ao sobrenadante com precipitação *overnight*.

As amostras de RNA total extraídas foram quantificadas e analisadas, quanto à integridade, em gel de agarose desnaturante 1% corado com brometo de etídeo.

Com o objetivo de diminuir a presença de falsos positivos que poderiam resultar da amplificação de fragmentos de DNA genômico, dois microgramas de RNA total extraído de cada órgão/tecido foram tratados com *DNase I* (*Deoxyribonuclease I*, Fermentas) segundo as recomendações do fabricante, para degradação de todo DNA genômico presente na amostra.

4.2.3 Validação da expressão tecido-específica dos ESTs candidatos

Após o tratamento com *DNase I*, cada alíquota de RNA foi submetida à transcrição reversa utilizando 0,5 μM de oligo(dT) e a enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a síntese da primeira fita de cDNA, a tecido-especificidade de cada candidato foi confirmada por meio de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 3) e alíquotas dos cDNAs dos órgãos/tecidos amostrados.

Para cada reação foi utilizado tampão de reação 1 X, 1,5 a 2,5 mM de MgCl_2 (de acordo com o par de oligonucleotídeos), 0,2 μM de cada oligonucleotídeo, 2,5 mM de cada dNTP, 0,5 U *Taq DNA Polymerase* (Fermentas) e 1 μl de cDNA. A amplificação foi realizada em aparelho PTC100 (MJ Research) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 60°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos gerados foram separados em géis de poliacrilamida 8% e corados com nitrato de prata.

4.3 Análises filogenéticas e estruturais

Com auxílio da ferramenta *Blast*, as seqüências dos ESTs candidatos validados com expressão tecido-específica SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01 foram comparadas primeiramente com o *GenBank* (NCBI), e depois suas seqüências foram traduzidas com auxílio da ferramenta *Translate* (<http://br.expasy.org>).

A seqüência deduzida de aminoácidos do candidato SCCCRT1004A07 foi então comparada aos bancos de dados *Arabidopsis Information Resource* (TAIR – <http://www.arabidopsis.org>), *DOE Joint Genome Institute* (JGI – <http://www.jgi.doe.gov>), *Institute for Genomic Research* (TIGR – <http://www.tigr.org>), Pfam (*Wellcome Trust Sanger Institute* – <http://www.sanger.ac.uk>) e SUCEST (<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br>) em busca de seqüências similares que auxiliassem na caracterização deste candidato. Somente seqüências completas de aminoácidos e com mais de 40% de identidade com a seqüência do candidato foram consideradas.

As seqüências de aminoácidos obtidas dos bancos de dados foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalX (Thompson et al., 1997) e uma árvore filogenética foi gerada pelo método de *neighbor-joining* e testada por *bootstrap* (2000 réplicas) com o programa MEGA3.1 (Kumar et al., 2004). O modelo da proteína foi criado utilizando os programas HHPred e *Modeller* (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de>) e para a análise de imagens e de estruturas conservadas utilizou-se o programa UCSF *Chimera* (Pettersen et al., 2004).

Tabela 3 – Resultado das análises de similaridade (*Blast*), tecido-especificidade *in silico* e validação (RT-PCR) dos *clusters* com padrão de expressão tecido-específico selecionados *in silico* do banco SUCEST. A seqüência dos oligonucleotídeos e o tamanho esperado dos produtos de amplificação (pb) da validação também são apresentados.

<i>Cluster</i>	<i>Blast</i>	NCBI	<i>E Value</i>	<i>In silico</i>	RT-PCR	Seqüência dos Oligos (5' → 3')	Tamanho
SCCCLR1048F12.g	14-3-3E, <i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare	ABC00201	1e ⁻⁴⁰	Todos	Todos	R – CGACACCAACGAGG F – CCAGCCATCATTATC	306
SCCCLR1069D05.g	Actina, <i>Oryza sativa</i> cv. japonica	AAO62546	2e ⁻¹⁰⁰	Todos	Todos	R – GTGGACGTACAACG F – CCTCTCTGCCCAATG	291
SCAGST3137E10.g	Sem similaridade	-	-	Entrenó	N	R – CAGCCGGTGGCCTGAA F – TCTTCTTCCCGGTCACATCTCT	82
SCCCCL5004F11.g	Proteína hipotética, <i>Oryza sativa</i> cv. japonica	AAO39858	5e ⁻⁶⁰	Entrenó	Todos	F – CTTTGGCCCTCTTCGATTGG R – CCCATCTCCAGCATTCTCAG	94
SCCCLR2001E10.g	Sem similaridade	-	-	Entrenó	Todos	R – AATCTGAGCTCGATCCTCTCC F – AAGGTACTCTCGCGCTCTCC	251
SCCCST1001A04.g	Transportador de aminoácido putativo, <i>Oryza sativa</i> cv. japonica	AAV24773	1e ⁻⁷³	Entrenó	Todos	R - GCCGGCAAGCGAAACTAC F - GGACCTTGATGCCACTGATGT	64
SCCCST1006H04.g	4,5-DOPA dioxygenase extradiol putativo, <i>Oryza sativa</i> cv. japonica	BAC06209	3e ⁻⁵⁴	Entrenó	Todos	R – CGCAGGGTACGTCAGCTTGT F – TCATCCACGGAACCAACGA	77
SCCCST1007C02.g	Pentatricopeptideo putativo, <i>Oryza sativa</i> cv. japonica	ABA97464	2e ⁻¹⁷	Entrenó	Todos	R – CGCCGTTGCCGTTGTC F – GCTTCCTCCCTGTCC	302
SCEZST3148D08.g	Sem similaridade	-	-	Entrenó	Todos	F – AACTAGCATTCCAAGCACG R – CGATGGTTGTTCTGCTTCA	113
SCJLST1020C05.g	Fator de splicing putativo, <i>Zea mays</i>	ABO47658	3e ⁻⁴⁴	Entrenó	N	F – TCTGCGGCTGCGAACA R – GGCAGTGCGGCGGTG	71
SCACCL6007G08.g	Piruvato ortofosfato diquinase, <i>Oryza sativa</i> cv. indica	CAA06247	1e ⁻⁶⁸	Folha	Todos	F – ATTCATGCTTGTCTTCAGGTC R – TCAATGTTGCCCTCTGGAAG	86
SCCCCL3001F01.g	Sem similaridade	-	-	Folha	Todos	F – CGCTCTTCTTGTGTAATGGC R – CCTGTGCGATGTGCTGTGAAG	78
SCCCLR1001E04.g	Sem similaridade	-	-	Folha	Todos	R – AAGGATCCGGTGCATGCA F – CGACAGCGTCTCGAACTTCTT	61
SCCCLV1001C11.g	Sem similaridade	-	-	Folha	Todos	R – TTGGCACCCAAGTAAGCATGT F - GCATTCTTTGTGCTTAGCTGTCA	79
SCEZAD1C05A07.g	Sem similaridade	-	-	Folha	Todos	F – GTGGTCATCTCAGCGATTGG R – CTCAGGTCCTAGAAGAAATCCAA	80

Cont. Tabela 3

Cluster	Blast	NCBI	E Value	In silico	RT-PCR	Sequência dos Oligos (5' → 3')	Tamanho
SCSGHR1071F08.g	Sem similaridade	-	-	Folha	Todos	F – TTCCCAAACGCTGTACAATCTCT R – CTCACATCATGTTTGCCTCA	70
SCSGHR1068B07.g	Proteína hipotética, <i>Oryza sativa</i> cv. indica	EAY86703	5e ⁻⁸⁰	Folha	A, C, L	F – CCGAGGGGAGAAGCTGC R – ACTGTATTCCTGTGTCTGTTGAG	77
SCSGLV1013B05.g	Sem similaridade	-	-	Folha	Todos	R – CACAAAGGAAAAAGGCCAAA F – TTCCACATCCCTGCACAAT	150
SCBGRT1052E01.g	Aquaporina TIP2-3, <i>Zea mays</i>	Q84RL6	1e ⁻¹³¹	Raiz	Raiz	F – GCTTGGGCGACTCTTTCAG R – AGGAGCGTGGCAATGAACT	67
SCCCRT1002B11.g	Horcolina, <i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare	AAK54458	6e ⁻²⁴	Raiz	A, F	R – CGCGTGAAATGTTTTCAGAAATG F – GCAGTCCACTCCATCCAGTT	131
SCCCRT1004A07.g	RCc3, <i>Oryza sativa</i> cv. japonica	AAA65513	1e ⁻⁴⁰	Raiz	Raiz	R – CCAGGTTCACGACCAGGAA F – AAGGAGGCTAGCTTGTGATCGA	68
SCCCRT2004C04.g	Proteína relacionada à patogênese 6, <i>Zea diploperennis</i>	ABA33838	5e ⁻⁹⁶	Raiz	Raiz 20dias	F – CAGTCCAACGGCATCAACCT R – CACCCGATGTTGCTGCC	84
SCCCRT2002D03.g	Proteína relacionada à patogênese 1.2, <i>Triticum aestivum</i>	CAA07474	2e ⁻⁶⁹	Raiz	A, L	F – GCGTTTCTGAAGAGGAGTGGTC R – GTCCTGCGGCGTGTCTG	99
SCCCRT3002G10.g	Proteína 1 de resposta a <i>Mayetiola destructor</i> , <i>Triticum aestivum</i>	AAM46813	4e ⁻³⁵	Raiz	Todos	R – TTAGCGGCAGGACCATCAC F – ACTACCAGAGTGGCGTTTGC	178
SCEPRT2043G11.g	Nodulina putativa, <i>Oryza sativa</i> cv. japonica	BAA83560	6e ⁻³⁸	Raiz	Todos	R – CCACCGGACAGGCTCTCA F – TTGTACAGCGCGATGAAG	64
SCEQRT1028D12.g	Peroxidase putativa	BAB12033	6e ⁻⁶⁵	Raiz	Todos	R – TCGGAGTGGAAAGGTGACGAT F – CCGGGTGC GCAAGGT	81
SCRFLR1012D12.g	nitrilase 2, <i>Zea mays</i>	AAO11742	3e ⁻¹⁰⁹	Raiz	Todos	R – CTCCAGGGCAAACAACAGTGT F – CCCCTCCACCGGAGTATGA	72
SCSBSD2029B04.g	Alpha kafirin, <i>Sorghum bicolor</i>	AAM94313	2e ⁻¹³	Semente	Todos	F – TTGCTAACCCATTGGCTGC R – ACGACAAGGCAGGGTTCATC	87
SCCCSD1001C07.g	Alpha kafirin, <i>Sorghum bicolor</i>	AAM94313	1e ⁻¹⁰	Semente	Todos	F – GATCAACCCTGCCTTGTTCATG R – CGCCGGTATGAGAGCTTTGT	99
SCCCSD1003B01.g	Sem similaridade	-	-	Semente	Semente	F – TTGGTGGTGCCTCTTTTAGA R – TCAGCCTAAAACTTCATTATTGA	63
SCCCSD2003F11.g	Sem similaridade	-	-	Semente	A, L, S	F – CCCTGCCTTGTCTGTGGC R – AAGTTGCACACGCCGACAC	97

A – todas as fases de desenvolvimento amostradas da raiz; C – casca; L – todas as fases de desenvolvimento amostradas da folha; N – amplificação inespecífica; S – semente.

4.4 Quantificação da expressão tecido-específica por PCR em tempo real

Os candidatos SCBGRT1052E01 e SCCCRT1004A07 foram avaliados por PCR em tempo real quanto à variação no nível de expressão nas diferentes idades/fases do desenvolvimento de raiz.

Foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos da validação inicial (Tabela 3), o reagente *SYBR Green Master Mix* (*Applied Biosystems*) e o aparelho *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*). O gene de referência utilizado para a normalização da quantidade de cDNA adicionado à reação foi uma poliubiquitina (SCCCST2001G02) (Papini-Terzi et al., 2005). Foram amplificadas três amostras de diferentes idades/fases do desenvolvimento de raiz e um *pool* dos cDNAs dos demais tecidos, sendo todas as reações realizadas em triplicata. Os cDNAs foram sintetizados utilizando 2 µg de RNA total, quantificados com auxílio do aparelho *ND-1000 Spectrophotometer* (*NanoDrop Technologies*). Os RNAs foram tratados com *DNase I* e transcritos utilizando a enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase*, seguindo as recomendações do fabricante. Para cada reação foram utilizados 6,25 µl de *SYBR Green Master Mix*, 0,2 µM de oligonucleotídeos, 1 µl de cDNA (diluído 1:20) e água para o volume final de 12,5 µl. As condições de amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem foi realizada uma curva de dissociação para todas as reações. A análise de eficiência de cada reação foi realizada com auxílio do programa *LinRegPCR* (Ramakers et al., 2003) e a quantificação relativa da expressão dos genes candidatos seguiu o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001).

4.5 Determinação do sítio de início de transcrição dos candidatos validados

4.5.1 Geração dos fragmentos e clonagem

Oligonucleotídeos foram desenhados nas extremidades 5' dos *reads* selecionados durante a validação biológica como representativos dos candidatos SCBGRT1052E01 e SCCCRT1004A07 seguindo as recomendações do fabricante do kit 5' *RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen). Para o candidato SCBGRT1052E01 foi adicionado um sítio para a enzima de restrição *Spe* I na extremidade 5' do oligonucleotídeo como pede o kit, mas notou-se que os produtos poderiam ser inseridos no vetor pGEM-T (*pGEM-T Easy System I*, Promega) tornando a presença deste sítio desnecessária. Em função disso, ele não foi adicionado ao oligonucleotídeo do candidato SCCCRT1004A07.

A transcrição reversa e amplificação foram realizadas a partir de um *pool* de RNAs totais de raízes em diferentes fases do desenvolvimento utilizando-se os oligonucleotídeos gene-específicos GSP1: 5'ACACCCACGAAGAG3' e GSP2: 5'GGACTAGTAAGAGGAGCGTGGCAATGAAC3' para o candidato SCBGRT1052E01 e GSP1: 5'ACTGCCACCTTAGC3' e GSP2 = P2: 5'CTACGCCCAGCACCACCAG3' para o candidato SCCCRT1004A07 e o kit 5' *RACE* seguindo o procedimento sugerido pelo fabricante. Os fragmentos gerados foram purificados utilizando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE), segundo recomendações do fabricante, e ligados ao vetor pGEM-T, utilizando 25 ng de fragmentos de DNA, 25 ng de pGEM-T, 1,5 U de T4 DNA ligase e tampão de ligação 1 X, em reação mantida a 4°C durante a noite. O produto desta ligação foi inserido em *Escherichia coli*, cepa DH5 α , pelo método de choque térmico e,

após crescimento, as bactérias foram espalhadas em meio LB (Luria-Bertani) sólido contendo X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside), IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) e o agente de seleção ampicilina, como descrito por Sambrook et al. (1989). Cerca de cinco colônias brancas contendo o inserto foram selecionadas para extração de plasmídeos utilizando o kit *CONCERT Rapid Plasmid Purification System* (Life Technologies). Uma parte da cultura utilizada na extração de plasmídeos foi mantida congelada (-80°C) como cultura permanente.

4.5.2 Obtenção e análise de seqüências

Os plasmídeos contendo os fragmentos gerados para determinação do sítio de início de transcrição foram seqüenciados utilizando oligonucleotídeos M13 *forward* (M13F) e *reverse* (M13R), o reagente *BigDye Terminator v.3.1* (*Applied Biosystems*) e o aparelho *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (*Applied Biosystems*). Cada reação de seqüenciamento continha *BigDye Sequencing Buffer 1 X*, 1,5 μ l de *Ready Reaction Mix*, 0,5 μ M de oligonucleotídeo, 300 ng de plasmídeo e água para um volume final de 10 μ l. As condições de amplificação foram aquelas recomendadas pela *Applied Biosystems* e a precipitação do produto de cada reação foi realizada seguindo o protocolo abaixo:

- 1 – Adicionar 80 μ l de isopropanol 75% e inverter várias vezes;
 - 2 – Deixar descansar no escuro por 15 minutos;
 - 3 – Centrifugar durante 45 minutos, a 2000 g, em temperatura ambiente;
 - 4 – Descartar o sobrenadante;
-

- 5 – Adicionar 150 µl de etanol 70%;
- 6 – Centrifugar durante 10 minutos, a 2000 g, em temperatura ambiente;
- 7 – Descartar o sobrenadante;
- 8 – Deixar secar no escuro, a temperatura ambiente, por 1 hora;
- 9 – Adicionar 3 µl de formamida *Hi-Di* (*Applied Biosystems*);
- 10 – Misturar bem e centrifugar brevemente;
- 11 – Desnaturar a 95°C por 5 minutos e resfriar em gelo rapidamente.

As seqüências obtidas foram analisadas, para a retirada de seqüências do vetor, com a ferramenta *VecScreen* (NCBI) e alinhadas para a geração de uma seqüência consenso utilizando o programa *BioEdit* (Hall, 1999). A seqüência consenso foi comparada à seqüência do EST candidato para determinação do sítio de início de transcrição.

4.6 Isolamento de seqüências promotoras por TAIL-PCR

4.6.1 Extração de DNA genômico de cana-de-açúcar

Uma amostra fresca de tecido foliar foi utilizada para extração do DNA genômico. A extração de DNA da cana-de-açúcar foi realizada utilizando protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998) com as seguintes modificações:

- 1 – O tecido foi solubilizado em 750 µl de tampão de extração;
 - 2 – Incubado a 65°C por 40 minutos;
-

- 3 – Foi realizada apenas uma extração com clorofórmio:álcool isoamílico;
- 4 – O sobrenadante foi precipitado em isopropanol gelado por 90 minutos a -20°C;
- 5 – O *pellet* foi lavado uma vez em álcool 70% e uma vez em álcool 95%;
- 6 – O *pellet* ressuspenso foi incubado por 20 minutos a 37°C.

A qualidade do DNA foi checada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e a quantificação realizada através da comparação das amostras extraídas contra um padrão de concentração conhecida.

4.6.2 Desenho dos oligonucleotídeos

Utilizando o programa *Primer3* foram desenhados pelo menos cinco oligonucleotídeos junto das extremidades 5' dos *reads* representativos dos *clusters* SCBGRT1052E01 e SCCCRT1004A07. Os critérios seguidos para o desenho dos oligonucleotídeos variaram de acordo com a etapa em que os mesmos seriam utilizados, mas, de forma geral, tiveram tamanhos entre 20 e 25 bases, T_m (*melting temperature*) entre 62 e 68°C e conteúdo de GC entre 40 e 80%.

4.6.3 Amplificação e clonagem das seqüências promotoras

A amplificação das seqüências promotoras dos candidatos validados foi realizada utilizando os oligonucleotídeos listados na Tabela 4 e a metodologia de TAIL-PCR descrita por Terauchi & Kahl (2000). Para amplificação do primeiro fragmento foram utilizados os oligonucleotídeos P1 a P5, para o segundo fragmento, os oligonucleotídeos P6 a P10 e para o terceiro fragmento, somente para SCCCRT1004A07, os oligonucleotídeos P10 a P14. Os fragmentos que apresentaram o padrão de bandas esperado foram isolados do gel de agarose e re-amplificados utilizando o oligonucleotídeo randômico, o gene-específico ou ambos, para confirmar se a região correta havia sido amplificada.

Os fragmentos amplificados somente na presença de ambos os oligonucleotídeos foram clonados no vetor pGEM-T e inseridos em *E. coli* cepa DH5 α , como descrito no item 4.5.1. Após a extração de plasmídeos, cinco clones de cada fragmento foram amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos M13F e M13R e o tamanho dos produtos foi confirmado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Tabela 4 – Oligonucleotídeos desenhados para a realização de TAIL-PCR da região promotora dos candidatos com expressão específica em raiz.

Oligo	SCCART1004A07 (5' → 3')	SCBGRT1052E01 (5' → 3')
P1	CACTGCCACCTTAGCTTTGAT	GCGAATAGGCAATGGCG
P2	CTACGCCAGCACCACCAG	AGGAGCGTGGCAATGAACT
P2A	GCACACGCCAGCTTCAG	-
P3	TCACGACCAGGAACAGCG	GCTGAAAGAGTCGCCAA
P4	CCTTGGACGCCATTGCTC	GCTTCACCATCTTTTTTCTTCT
P5	CGCAGATCACTCTAATCAATGTA	GACGGTATTTTCAGGCTTTCA
P6	CTTGTTTGGCGATGCTTTGAT	TGCTGTGGAATTGTGGTTGT
P7	CGAGCCTTGGGATTTAAGA	CACCATCAAACAGCAAGGAG
P8	TAGGCACAATAGCGTTCATG	TCAATTCTCATCTCATGCCTAAAC
P9	GGATTATTATGGACATTGCGT	CGATCCTTTATTTCTACCCTGC
P10	AAATGGTCAAGATCGCTGC	TCTCCGTGGCGTGGTTC
P11	GCTTCCACTCACGCTTGTT	
P12	GCTTGGGATCTTGGCGTAT	
P13	GTGGTGCAGAGGACATTGGA	
P14	GTGGCGTGGCTGCGAT	

4.6.4 Obtenção e análise das seqüências promotoras

Para cada inserto, pelo menos três clones foram seqüenciados e analisados como descrito no item 4.5.2. O alinhamento das seqüências consensos obtidas com as seqüências de nucleotídeos dos *reads* originais foi realizado com auxílio da ferramenta *Bl2seq* (Tatusova & Madden, 1999) a fim de verificar se as referidas seqüências apresentavam uma região de sobreposição em suas extremidades.

As primeiras seqüências consenso serviram de base para o desenho de novos oligonucleotídeos para novas amplificações por TAIL-PCR, a fim de aumentar o tamanho da seqüência promotora.

As seqüências promotoras consenso obtidas para cada candidato foram comparadas com o banco de dados de elementos regulatórios de plantas, PLACE (*Plant cis-acting regulatory DNA elements* – Higo et al., 1999) em busca de possíveis elementos regulatórios.

4.7 Clonagem em vetor de expressão para transformação de plantas

4.7.1 Desenho de oligonucleotídeos

Com base na seqüência consenso dos promotores tecido-específicos putativos foram desenhados oligonucleotídeos específicos, sendo um deles posicionado à montante e adjacente ao início da região codificadora do EST (ATG) (oligonucleotídeo *reverse*) e outros dois na porção 5' do fragmento amplificado por TAIL-PCR (oligonucleotídeos *forward*), para cada uma das seqüências promotoras. Na extremidade 5' de cada um desses oligos foi adicionado um sítio para uma enzima de restrição a fim de permitir a inserção direcional do fragmento promotor no vetor de expressão. Aos oligonucleotídeos *reverse* foram adicionados sítios para a enzima de restrição *Nco* I e aos oligonucleotídeos *forward* foram adicionados sítios para a enzima *Bam*H I.

4.7.2 Amplificação e Clonagem dos fragmentos

As regiões promotoras foram amplificadas utilizando os oligonucleotídeos listados na Tabela 5 em reação composta por: tampão 1 X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 μM de cada oligonucleotídeo, 2,5 mM de cada dNTP, 0,5 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) e 30 ng de DNA genômico de cana-de-açúcar. A amplificação foi realizada em aparelho PTC100 sob a ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos gerados foram separados em géis de agarose 1,5% corados com brometo de etídeo para verificação do seu tamanho e eliminação dos reagentes da reação de amplificação.

Tabela 5 – Oligonucleotídeos usados na amplificação da região promotora dos candidatos SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01 para posterior clonagem em vetor de expressão.

Candidato	Versão	Oligonucleotídeos (5' → 3')	Tamanho (pb)
SCBGRT1052E01	C1	F – CGCGGATCCACTGGGACTCCTAGCATAG R – CATGCCATGGCTTTTTTCTTCTCTGACGG	592
SCBGRT1052E01	L1	F – CGCGGATCCGACGCATGGAGCATTAA	1040
SCCCRT1004A07	C2	F – CGCGGATCCAGATCCCGCCCCTAA R – CATGCCATGGTGCTCGATCACAAGCTAG	516
SCCCRT1004A07	L2	F – CGCGGATCCCATCCCAGCTCCACGTAT	1139

Após extração das bandas do gel utilizando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, os fragmentos foram digeridos com as enzimas de restrição *Nco* I e *Bam*H I e novamente separados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e purificados. Os vetores pCAMBIA-1381 e pCAMBIA-1381Z (Cambia) contendo o gene repórter GUS (*β-glucuronidase*) também foram digeridos com as enzimas de restrição

Nco I e *Bam*H I, separados por eletroforese em géis de agarose e purificados utilizando o kit *GFX*.

Estes dois vetores têm como característica a ausência de um promotor para o gene repórter GUS sendo, portanto, próprios para o teste de regiões promotoras em planta, sua diferença está na presença de um íntron no início do gene GUS no vetor pCAMBIA-1381Z, que evitaria a expressão do gene repórter por procariotos, como *Agrobacterium tumefaciens*.

A ligação dos referidos vetores aos fragmentos promotores foi realizada utilizando tampão de reação 1 X, aproximadamente 45 ng de vetor, 15 ng de fragmento e 1 U de *T4* DNA *ligase* (Fermentas), segundo recomendações do fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram inseridos em *E. coli* cepa DH5 α tornadas competentes pelo método de cloreto de cálcio (Sambrook et al., 1989), transformadas por choque térmico e, após crescimento, as bactérias foram espalhadas em meio LB sólido contendo o agente de seleção canamicina (50 mg/ml). Cerca de cinco colônias foram selecionadas para extração de plasmídeos utilizando o kit *CONCERT*. Uma parte da cultura utilizada na extração de plasmídeos foi mantida congelada (-80°C) como cultura permanente.

Pelo menos dois clones foram analisados quanto ao tamanho dos plasmídeos e de seus insertos bem como ao padrão de digestão com a enzima de restrição *Ssp* I. Os clones que apresentaram todos os padrões esperados foram seqüenciados, como descrito no item 4.5.2, utilizando o oligonucleotídeo 5'GACTGAATGCCACAGG3' que é capaz de se anelar junto à porção 5' do gene repórter GUS de maneira que foi possível verificar se a inserção do fragmento promotor putativo em relação ao gene repórter estava correta.

4.8 Ensaio de expressão transiente em cana-de-açúcar

4.8.1 Biobalística

Para os ensaios de expressão transiente, midi-preparações dos plasmídeos recombinantes pCAMBIA-1381Z, contendo o gene repórter GUS sob controle das seqüências curtas e longas dos promotores putativos isolados (C1, C2, L1 e L2), foram realizadas com auxílio do kit *QIAGEN Plasmid Midi* (Qiagen). Como material vegetal, foram utilizadas plântulas de cana-de-açúcar medindo até quatro centímetros cultivadas *in vitro*.

Para o bombardeamento foram usadas partículas de ouro e o protocolo descrito por Falco et al. (2000) com uma pressão de hélio de 500 psi (*pounds per square inch absolute*). Após o bombardeamento, as plântulas foram mantidas em meio MS (Murashige & Skoog; *Basal Medium*, Sigma) e em câmara climatizada com fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e temperatura de 22°C ± 2°C, por 48 horas.

4.8.2 Análise histoquímica de GUS

Quarenta e oito horas após o bombardeamento das plântulas, as mesmas foram submetidas ao ensaio histoquímico empregando o substrato X-Gluc (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid*) e a metodologia a seguir:

- 1 – Adicionar etanol 70% em volume suficiente cobrir a amostra;
 - 2 – Incubar por um minuto;
 - 3 – Descartar o etanol 70%;
 - 4 – Adicionar tampão fosfato 1 M pH7,1 em volume suficiente cobrir a amostra;
-

- 5 – Submeter as amostras ao vácuo por 5 minutos;
- 6 – Descartar o tampão fosfato;
- 7 – Adicionar tampão de reação (100 mM NaH₂PO₄, 0,5 M K₄Fe(CN)₆, 10 mM Na₂HPO₄, 0,1% Triton X-100, 1 mM X-Gluc, Brasileiro & Carneiro, 1998) em volume suficiente para cobrir a amostra;
- 8 – Submeter as amostras ao vácuo por 10 minutos;
- 9 – Incubar a 37°C por 24 horas;
- 10 – Descartar o tampão de reação;
- 11 – Adicionar etanol 70% em volume suficiente cobrir a amostra;
- 12 – Depois de retirada a clorofila, adicionar glicerol 50%.

4.9 Análise funcional dos promotores em plantas de cana-de-açúcar

4.9.1 Obtenção das plantas transgênicas

Aliquotas dos plasmídeos pCAMBIA-1381 contendo os fragmentos curto e longo do candidato SCBGRT1052E01 (C1 e L1) e pCAMBIA-1381Z contendo o fragmento curto do candidato SCCCRT1004A07 (C2), extraídas com auxílio do kit *QIAGEN Plasmid Midi*, foram enviados ao CTC para a transformação de cana-de-açúcar. A metodologia utilizada na transformação foi a descrita por Falco et al. (2000), utilizando co-transformação com o plasmídeo pHA9 que contém o gene *neo* (*neomycin*) sob controle do promotor do gene que codifica a ubiquitina de milho (*Ubi-1*). Para tal foram utilizadas as variedades de cana-de-açúcar SP80-3280 e SP80-185.

A seleção de plantas transformadas foi realizada utilizando *geneticin* (Invitrogen), segundo descrito por Falco et al. (2000). Também foi avaliada a presença do gene repórter por meio de ampliações por PCR empregando os oligonucleotídeos GUS F: 5'GTAGAAACCCCAACCCGTGA3' e GUS R: 5'GTCTGCCAGTTCAGTTCGTTGTTTC3' e DNA genômico extraído de folhas frescas das plantas transformadas como descrito no item 4.6.1. Cada reação continha tampão de reação 1 X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 μM de cada oligonucleotídeo, 2,5 mM de cada dNTP, 0,5 U *Taq* DNA *Polymerase* (Fermentas) e 30 ng de DNA genômico. A amplificação foi realizada em aparelho PTC100 sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 60°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos gerados foram separados em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídeo.

As plantas que não apresentavam a inserção do gene GUS em seu genoma foram devidamente descartadas enquanto as plantas positivas foram mantidas em casa de vegetação no CTC para futuras análises.

4.9.2 Análise histoquímica de GUS

As plantas positivas (R0) foram avaliadas quanto à atividade de GUS conforme descrito no item 4.8.2. Raiz, folha e bainha da folha das plantas transformadas foram amostradas para o teste histoquímico.

4.9.3 Análise da expressão do gene GUS por RT-PCR

Amostras de raiz, folha e entrenó de 12 plantas transformadas (duas plantas contendo fragmento curto – C1 e dez contendo o fragmento longo do candidato SCBGRT1052E01 – L1) foram coletadas e imediatamente congeladas e armazenadas. Foram extraídas amostras de RNA total dos materiais coletados como descrito no item 4.2.2, sendo a quantificação realizada no aparelho *ND-1000 Spectrophotometer* e a qualidade observada em gel de agarose desnaturante 1% corado com brometo de etídeo.

O RNA total extraído dos referidos órgãos/tecidos foi tratado com *DNase I* e alíquotas de 130 ng de cada amostra submetidas à amplificação por PCR com os oligonucleotídeos e condições descritas no item 4.9.1 para verificar se ainda havia contaminação com DNA genômico. Em seguida, foi realizada transcrição reversa e PCR empregando os oligonucleotídeos GUS F e R, GUS R e SCBGRT1052E01/C1 *forward* e SCCCRT1004A07/C2 *forward* e *reverse*. Os produtos gerados foram separados em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídeo.

4.10 Análise funcional dos promotores em plantas de tabaco

4.10.1 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Uma colônia de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem LBA4404 foi inoculada em 3 ml de meio LB líquido (contendo 300 µg/ml de estreptomicina e 100 µg/ml de rifampicina) e incubada sob agitação (~100 rpm) a 28°C até atingir A_{600} entre 0,5 e 1,0. Dois mililitros da referida cultura foram então acrescentados a 50 ml de meio LB líquido e novamente incubados sob agitação a 28°C até atingir a fase exponencial de crescimento, quando a cultura foi mantida em gelo por 15 minutos. Após este período, as células foram

centrifugadas a 1000 g por 15 minutos a 4°C, o meio foi descartado e as células ressuspendidas em 1 ml de uma solução de CaCl₂ 20 mM gelada.

Duas alíquotas de um micrograma de vetor pCAMBIA-1381Z contendo a versão menor do candidato SCCCRT1004A07 (C2) e a versão maior do candidato SCBGRT1052E01 (L1), respectivamente, foram acrescentados a alíquotas de 100 µl de células de *A. tumefaciens* competentes e incubadas em gelo por 30 minutos. Após um choque térmico, nitrogênio líquido/37°C por 5 minutos, foi acrescentado 1 ml de meio LB e a cultura foi mantida sob leve agitação por 2 horas a 28°C. As células transformadas foram espalhadas em placas de Petri com meio LB sólido (contendo 300 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de rifampicina e 100 µg/ml de canamicina) e incubadas a 28°C.

Foram selecionadas algumas colônias para extração de plasmídeos e preparação da cultura permanente. A transformação das células de *A. tumefaciens* foi confirmada pela amplificação por PCR do fragmento inserido no vetor de expressão, utilizando os oligonucleotídeos para os fragmentos menores listados na Tabela 5 e as condições descritas no item 4.7.2. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.10.2 Obtenção das plantas de tabaco transgênicas

Uma colônia isolada de *A. tumefaciens* contendo o vetor recombinante foi inoculada em meio LB líquido (contendo 300 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de rifampicina e 100 µg/ml de canamicina) e incubada sob agitação a 28°C até atingir a fase exponencial de crescimento, quando então a cultura foi diluída 10 vezes em meio LB.

Discos foliares estéreis de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) com 2 cm de diâmetro foram colocados em contato com a cultura de *A. tumefaciens* e mantidos sob leve agitação por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a retirada do excesso de bactérias, os discos foliares foram transferidos para placas de Petri com meio MS (contendo 0,23% de *phytagel* – Sigma; 0,1 µg/ml de ANA – ácido naftalenoacético e 2 µg/ml de BAP – 6-benzilaminopurina). As placas foram mantidas no escuro por 48 horas a 28°C. Após este período, os discos foliares foram transferidos para um meio de regeneração (MS contendo 0,23% de *phytagel*; 0,1 µg/ml de ANA e 2 µg/ml de BAP) contendo agentes de seleção (300 µg/ml de cefotaxima sódica e 50 µg/ml de higromicina-B) e mantidos em câmara climatizada com fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e temperatura de 22°C ± 2°C.

Após cerca de quatro semanas os calos foram separados e transferidos para um novo meio de regeneração. Os brotos regenerados foram transferidos para frascos com meio de enraizamento (MS contendo 0,23% de *phytagel*; 0,1 µg/ml de ANA, 300 µg/ml de cefotaxima sódica e 50 µg/ml de higromicina-B). As plantas enraizadas foram transferidas para vasos com terra vegetal e permanecerão em casa de vegetação até a coleta das sementes.

4.10.3 Análise histoquímica de GUS

As linhagens regeneradas de tabaco (R0) tiveram diferentes tecidos amostrados para o teste histoquímico, onde se objetivou visualizar a atividade de GUS conforme descrito no item 4.8.2. Nessa análise foram utilizadas amostras de raiz, folha, pecíolo e caule.



5. Resultados

5.1 Identificação de *clusters* com padrão de expressão tecido-específico no banco do SUCEST

5.1.1 Seleção de *clusters*

Dos mais de 40.000 *clusters* resultantes da análise das seqüências obtidas pelo programa de seqüenciamento de ESTs de cana-de-açúcar (SUCEST), 667 foram tecido-específicos segundo os parâmetros estabelecidos pela análise *in silico*, ou seja, eram compostos por *reads* provenientes de um único tecido/órgão. Destes 667 *clusters*, 29 apresentando expressão específica em determinados tecidos e dois normalizadores (genes com expressão ubíqua) foram selecionados para o desenho de oligonucleotídeos e validação biológica (Tabela 3).

5.1.2 Análise das seqüências

Utilizando a ferramenta *Blast*, as seqüências deduzidas de aminiácidos dos candidatos tecido-específicos na análise *in silico* foram avaliadas quanto a sua similaridade às seqüências de proteínas depositadas no *GenBank* (Tabela 3), adotando como valor máximo de $E\text{-value} = e^{-5}$. A maioria dos candidatos apresentou similaridade com alguma proteína já descrita, porém 11 deles não apresentaram similaridade significativa à nenhuma seqüência depositada, três selecionados *in silico* com expressão específica em entrenó, seis em folha e dois em semente. Todas as seqüências dos candidatos selecionados com padrão de expressão específico em raiz apresentaram similaridade significativa à proteínas já descritas.

As seqüências de alguns candidatos selecionados apresentaram elevado valor de *E-value*, indicando alta similaridade com seqüências de proteínas depositadas no *GenBank*, como por exemplo a seqüência do candidato SCBGRT1052E01 ($1e^{-131}$) que deve codificar uma aquaporina e do candidato SCRFLR1012D12 ($3e^{-109}$), que provavelmente é uma nitrilase.

5.2 Confirmação da expressão tecido-específica por RT-PCR

5.2.1 Desenho de oligonucleotídeos

Os 16 primeiros pares de oligonucleotídeos utilizados para validação geraram produtos de 150 a 300 pb. Destes, nove não geraram produtos de PCR ou amplificaram produtos inespecíficos e foram redesenhados utilizando o programa *PrimerExpress*. Estes novos oligonucleotídeos geraram produtos específicos e com até 100 pb, ideais para utilização em PCR em tempo real, possibilitando não só a validação dos candidatos com expressão tecido-específica como também a quantificação relativa da expressão dos mesmos (Tabela 3).

5.2.2 Validação da expressão tecido-específica dos ESTs candidatos

RNAs totais extraídos de todos os órgãos/tecidos amostrados de cana-de-açúcar foram quantificados e tratados com *DNase* I para degradação de DNA contaminante. Aliquotas desses RNAs foram então submetidas a transcrição reversa e os cDNAs amplificados com os oligonucleotídeos para os candidatos selecionados (Tabela 3). Dentre os 16 primeiros pares de oligonucleotídeos sintetizados (para 14 candidatos e os dois com expressão ubíqua), nove foram redesenhados e destes, apenas os oligos para SCAGST3137E10 continuaram apresentando padrão inespecífico. Para os outros 15 candidatos foram desenhados oligonucleotídeos que amplificassem produtos pequenos e destes apenas um par (SCJLST1020C05) não gerou produto único.

A expressão foi considerada tecido-específica para os candidatos cujos oligonucleotídeos permitiram a amplificação de um produto de tamanho esperado e que estava presente em um único órgão/tecido amostrado. Como pode ser observado na Tabela 3, a maioria dos candidatos apresentou produtos de amplificação em mais de um órgão/tecido. Dos 29 candidatos selecionados da análise *in silico*, quatro tiveram sua expressão tecido-específica confirmada segundo a validação por RT-PCR: SCCCRT1004A07, SCBGRT1052E01 e SCCCRT2004C04 de raiz, e SCCSD1003B01 de semente (Figura 2).

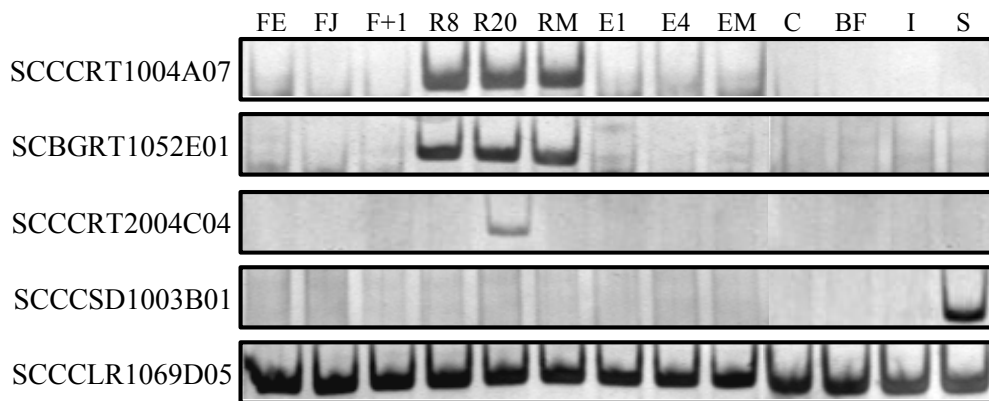


Figura 2 – *Clusters* validados por RT-PCR com padrão de expressão tecido-específico. FE – folha enrolada; FJ – folha jovem; F+1 – folha +1; R8 – raiz com 8 dias; R20 – raiz com 20 dias; RM – raiz madura; E1 – entrenó 1; E4 – entrenó 4; EM – entrenó maduro; C – casca; BF – bainha da folha, I – inflorescência e S – semente.

Por possuírem o códon de início de tradução, possibilitando a busca direta pelas regiões promotoras e por apresentarem maior importância e aplicação imediata no melhoramento da cana-de-açúcar pela transgenia, os candidatos SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01 foram escolhidos como prioridade para a caracterização dos genes e isolamento de regiões promotoras.

5.3 Análises filogenéticas e estruturais

A análise de similaridade indicou que a seqüência de nucleotídeos do candidato SCBGRT1052E01 codifica uma proteína de membrana, mais especificamente uma aquaporina (acesso no NCBI: Q84RL6), enquanto a seqüência do candidato SCCCRT1004A07 é similar (*E-value*: $1e^{-40}$) à seqüência da proteína RCc3 (AAA65513), que faz o transporte de lipídios especificamente em raízes de tabaco (Xu et al., 1995).

Quando a seqüência do candidato SCCCRT1004A07 foi comparada às seqüências depositadas em diferentes bancos de dados, foram obtidas 172 seqüências completas em 15 espécies de três classes de plantas (Eudicotyledons, Coniferopsida e Liliopsida). Somente no SUCEST foram encontrados 37 ESTs completos codificando pelo menos 11 diferentes proteínas variavelmente expressas em todos os tecidos de cana-de-açúcar. Para selecionar as seqüências mais similares à seqüência do candidato foi adotado como critério um mínimo de 40% de similaridade, restringindo o número de seqüências a 84 de dez espécies das classes Eudicotyledons e Liliopsida (Anexo).

A Figura 3 apresenta a árvore obtida por *neighbor joining*. Esta árvore é formada por três grupos principais os quais possuem vários subgrupos compostos, de maneira geral, por seqüências da uma mesma espécie (grupos coloridos). O candidato SCCCRT1004A07 integra um grupo formado exclusivamente por seqüências provenientes de espécies da família Poaceae. As seqüências das espécies da subclasse Rosids (Eudicotyledons) formaram um grupo isolado (cinza), mas muito relacionado às seqüências de todas as outras espécies.

Um modelo da estrutura parcial da proteína codificada pelo candidato SCCCRT1004A07 foi criado utilizando como modelo a estrutura de uma proteína hidrofóbica de soja (1hyp, Baud et al., 1993) depositada no Protein Data Bank – PDB (<http://www.pdb.org>). Com base no modelo apresentado na Figura 4A é possível observar que a proteína é composta por quatro alfas-hélice e que a mesma apresenta uma cavidade hidrofóbica (Figura 4C; seta). A estrutura parcial criada a partir do alinhamento das 84 seqüências que apresentaram no mínimo 40% de similaridade a SCCCRT1004A07 demonstrou que esta região analisada nas estruturas é uma região conservada entre as 10 espécies analisadas e a cavidade hidrofóbica é a região que mais concentra aminoácidos conservados (Figura 4F, seta).

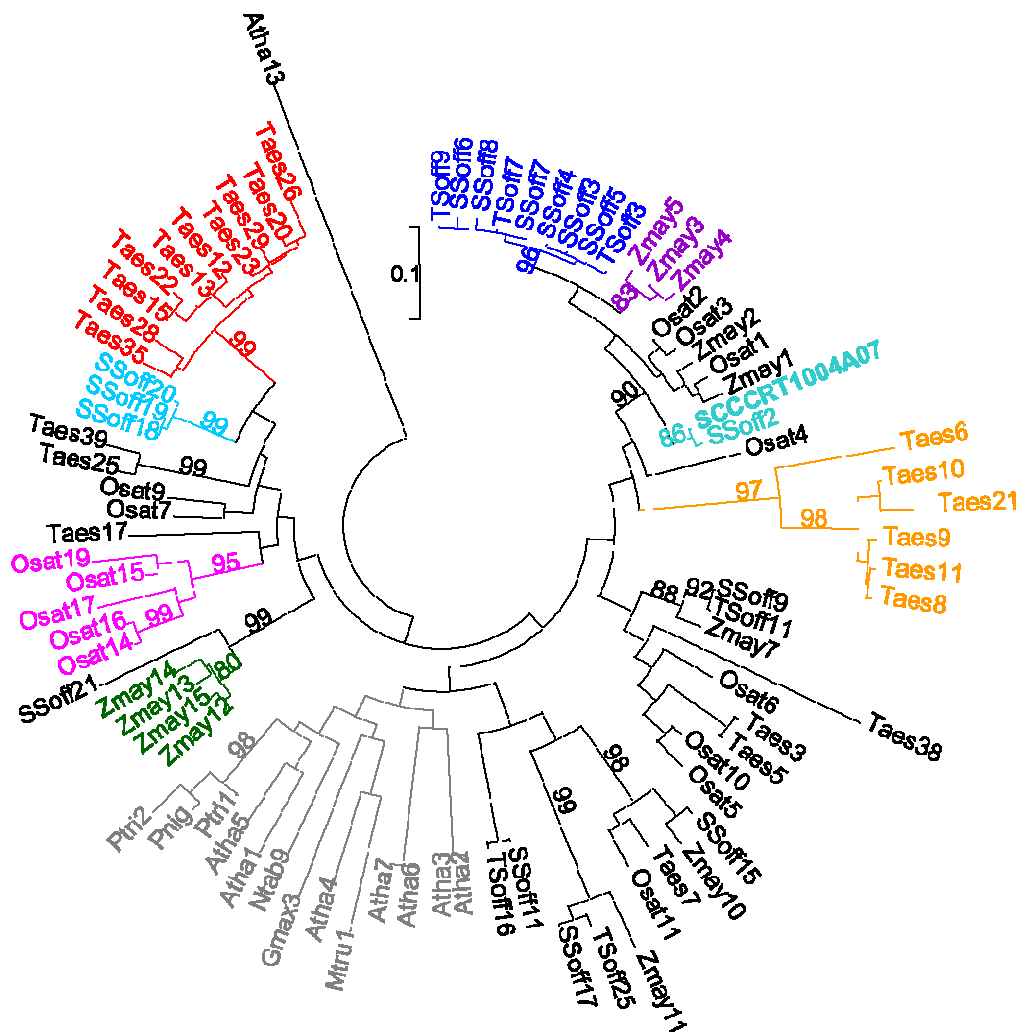


Figura 3 – Árvore filogenética gerada pelo método de *neighbor-joining* empregando seqüências similares a SCCCRT1004A07 de diferentes espécies de plantas. *Arabidopsis thaliana* (Atha), *Glycine max* (Gmax), *Medicago truncatula* (Mtru), *Nicotiana tabacum* (Ntab), *Oryza sativa* (Osat), *Populus nigra* (Pnig), *Populus trichocarpa* (Ptri), *Saccharum officinarum* (TSoff –TIGR; SSoff – SUCEST), *Triticum aestivum* (Taes) e *Zea mays* (Zmay). Grupos coloridos são formados por seqüências de uma única espécie; grupo cinza é composto por espécies de Rosids. Valores significativos de *bootstrap* são indicados.

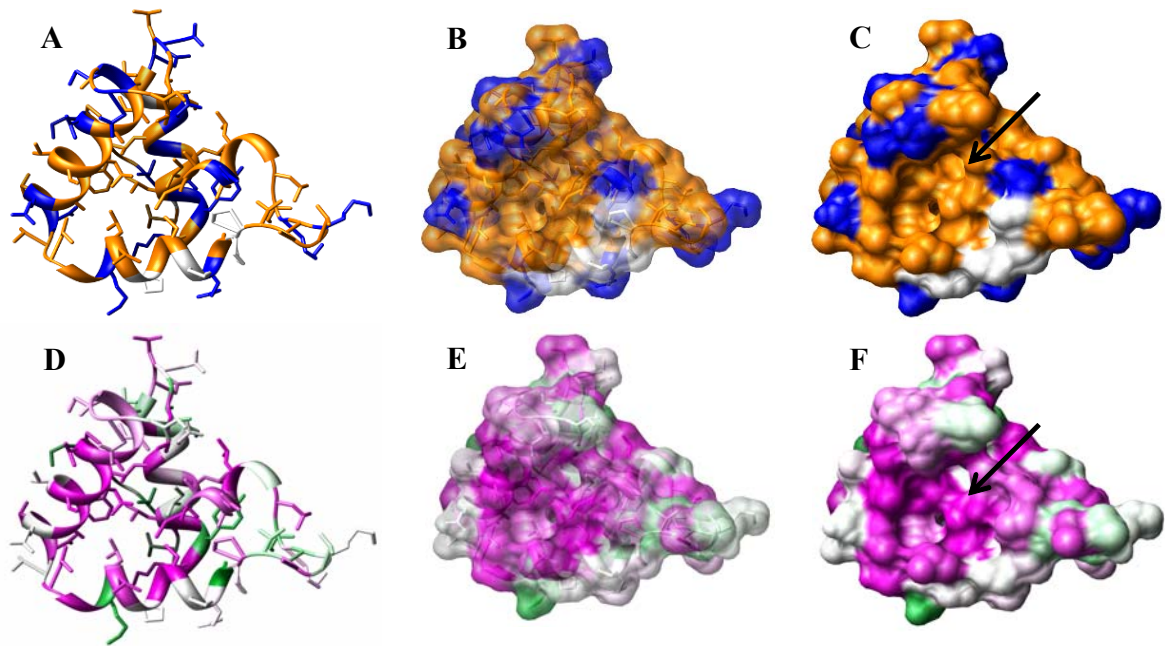


Figura 4 – Estrutura parcial da proteína codificada por SCCCRT1004A07. A e D – Representação em fita; B e E – Superfície semi-transparente/fita; C e F – Representação da superfície. Regiões hidrofóbicas em laranja e polares em azul. Aminoácidos conservados nas 84 seqüências analisadas em rosa e variáveis em verde. Cavidade hidrofóbica (setas) concentra aminoácidos conservados.

5.4 Quantificação da expressão tecido-específica por PCR em tempo real

Os candidatos validados, apresentando padrão de expressão específica em raiz, SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01, foram analisados por PCR em tempo real, utilizando os mesmos oligonucleotídeos da validação da especificidade de expressão. A análise da eficiência de amplificação demonstrou que todas as reações apresentaram valores muito parecidos e próximos de 2, permitindo o uso do método de Livak & Schmittgen (2001) para o cálculo da expressão relativa.

A ausência total de expressão em órgãos/tecidos diferentes da raiz foi confirmada para o candidato SCCCRT1004A07 (dado não apresentado). Para o candidato SCBGRT1052E01 foi observado início de amplificação (próximo ao 40º ciclo) para outros órgãos/tecidos, o que fez com que a expressão relativa deste candidato quando comparada aos demais tecidos fosse pelo menos 500 vezes superior em raiz.

A Figura 5 apresenta a expressão relativa dos dois candidatos analisados em três diferentes fases de desenvolvimento da raiz, utilizando como tecido referência a raiz madura. Uma variação no nível de expressão dos dois candidatos nas três amostras analisadas foi observada, sendo a expressão relativa, em geral, maior em raízes mais jovens. Para o candidato SCCCRT1004A07, a maior diferença de expressão foi encontrada entre raízes com 20 dias e raízes maduras (duas vezes). Para o SCBGRT1052E01 a expressão em raízes com 8 dias é uma vez maior que aquela observada em raízes maduras.

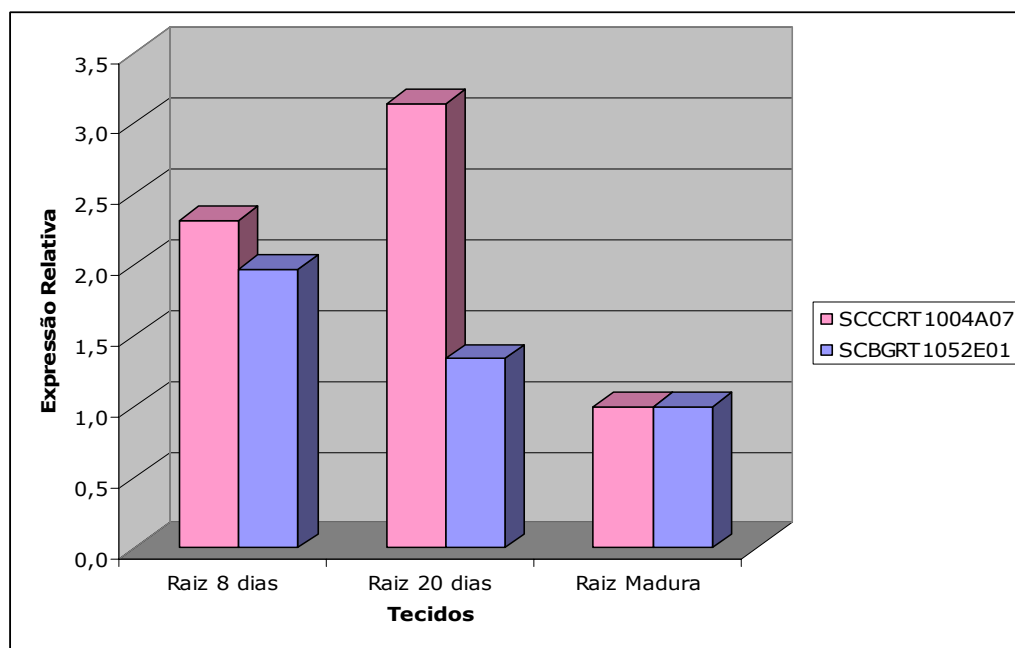


Figura 5 – Expressão relativa dos candidatos com expressão tecido-específica SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01 em raízes de diferentes idades, quantificada por PCR em tempo real. Foram utilizados como referências o gene da poliubiquitina (SCCCST2001G02) e raiz madura.

5.5 Determinação do sítio de início de transcrição dos candidatos validados

Foram isolados dois fragmentos, um de aproximadamente 200 pares de base e outro de 250, para os candidatos SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01, respectivamente. Estes fragmentos foram clonados em vetor pGEM-T e seqüenciados.

Analisando as seqüências obtidas, foi observado que ambos os fragmentos amplificados apresentavam regiões complementares aos respectivos ESTs e portanto, permitiriam determinar o ponto de início de transcrição com exatidão. Nas Figuras 6 e 7 as regiões transcritas mas não traduzidas (5' UTR – *untranslated region*) são representadas por letras minúsculas para os candidatos SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01, respectivamente.

5.6 Isolamento de seqüências promotoras por TAIL-PCR

5.6.1 Amplificação e clonagem das seqüências promotoras

Foi realizada amplificação pelo método de TAIL-PCR de seqüências localizadas à montante da seqüência dos ESTs dos candidatos validados SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01 utilizando DNA genômico de cana-de-açúcar e os oligonucleotídeos listados na Tabela 4.

Utilizando as condições de amplificação descritas por Terauchi & Kahl (2000), foram gerados três fragmentos para o candidato SCCCRT1004A07 e dois para o candidato SCBGRT1052E01. O candidato SCBGRT1052E01 foi o que apresentou os

melhores resultados para o TAIL-PCR, uma vez que necessitou de apenas 18 oligonucleotídeos randômicos para a obtenção de cada um dos fragmentos, que cobriram a região promotora putativa com tamanho considerado adequado (Tabela 6). Por outro lado, para o candidato SCCCRT1004A07 foram testados 30, 36 e 18 oligonucleotídeos randômicos para amplificação do primeiro, segundo e terceiro fragmentos, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultado do TAIL-PCR para os candidatos SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01 indicando o número de oligonucleotídeos randômicos testados e o tamanho dos fragmentos obtidos.

Candidato	Oligonucleotídeos Randômicos	Tamanho (pb)
<i>SCCCRT1004A07</i>		
Primeiro fragmento	30	316
Segundo fragmento	36	204
Terceiro fragmento	18	706
<i>SCBGRT1052E01</i>		
Primeiro fragmento	18	578
Segundo fragmento	18	536

5.6.2 Obtenção e análise das seqüências promotoras

Foram geradas seqüências *forward* e *reverse* e, em seguida, seqüências consenso para cada um dos fragmentos clonados (Figuras 6 e 7). O alinhamento destes consensos com as seqüências dos ESTs candidatos indicou uma região de sobreposição entre eles, confirmando o posicionamento das regiões amplificadas por TAIL-PCR na extremidade 5' do EST.

A análise comparativa das seqüências consenso obtidas no banco de dados PLACE identificou a presença de vários elementos regulatórios putativos. Na seqüência promotora putativa isolada para o candidato SCCCRT1004A07 (Figura 6), foram observados vários sítios *CAAT Box*, dentre eles, um que ocorre a -94 pb do ponto de início de transcrição. O elemento *TATA Box* identificado foi do tipo *TATABOX1* (Grace et al., 2004) e está posicionado a -47 pb do ponto de início de transcrição. Também foram encontrados os elementos *ROOTMOTIFTAPOXI* (Elmayan & Tepfer, 1995), repetido três vezes, já foi encontrado no promotor de um gene de *Agrobacterium rhizogenes*, associado à expressão em tecidos de raiz, *ARRIAT* (Sakai et al., 2000), que assim como *OSE2ROOTNODULE* (Vieweg et al., 2004) e 'GAAGAG' (Uchiumi et al., 2002), é encontrado em promotores de genes de resposta a infecção por bactérias ou fungos em nódulos de raiz, e *MYCATERDI* (Tran et al., 2004), que assim como *MYCATRD22* (Abe et al., 1997) e *MYCCONSENSUSAT* (Chinnusamy et al., 2003), está relacionado à resposta a estresse por frio e seca.

Já na seqüência promotora putativa isolada para o candidato SCBGRT1052E01 (Figura 7) foram observados elementos regulatórios relacionados à resposta a estresse, como *LTRE1HVBLT49*, elemento de resposta à baixa temperatura (*LTRE-1 – low-temperature-responsive element*) em cevada (Dunn et al., 1998) e *DRECRTCOREAT*, elemento central de resposta à desidratação (*DRE/CRT – dehydration-responsive element/C-repeat*) em arroz (Dubouzet et al., 2003), milho (Qin et al., 2004), girassol (Diaz-Martin et al., 2005) e *Arabidopsis* (Suzuki et al., 2005). Foram observados ainda os elementos *ROOTMOTIFTAPOXI* e *OSE2ROOTNODULE*, repetidos duas vezes, presentes também na seqüência promotora do candidato SCCCRT1004A07. Segundo o PLACE, a referida seqüência promotora apresenta um elemento *TATA Box*, do tipo

TATABOXOSPAL, que foi caracterizado em arroz por Zhu et al. (2002), a -26 pb do sítio de início de transcrição, e vários elementos *CAAT Box*, um deles localizado a -118 pb do ponto de início de transcrição.

Cabe destacar ainda que nas duas seqüências promotoras foram observados muitos elementos *GATA Box*.

5'CCATCCCAGCTCCACGTATATTCTGACAAGATTGACTTAGTCACTTGCATGCC
 ROOTMOTIFTAPOX ARR1AT
 AGTGTGAAACTCTGGATGCCTAGGTCAGAGGCCAGCGACAGGCCTTCTGGCATG
 CCACGGCTTCTACCTGCTCTAGGTTTGTATGCCTAACATCACCACAGCGGACGCT
 CCTAAGAACACGCCGTTGTCATTCTCGCCACCACAGCAGCCGAGCCAACTGCAA
 GACCTCTTGTGACAGAGCTTTTTTTTTTTTTGAGTGGAACCTCTTGTGACAGAGCTGC
 OSE2ROOTNODULE OSE2ROOTNODULE
 ATCAACGCCGGCCAAGTGCCTGGGATTTGGGAATCGCTTCTTCTCCCTTCTC
 GGTCCCCAAGGCCTAGGCCTGCCACGCTGTAGGCTGGTTGCTTCCCGAGCAA
 GAAGGCCGGTCCATGTGCTCAAATTAAGTTGATAGGCCATCGGAACAAATG
 MYCATERD1 GATA BOX MYCCONSENSUSAT
 ATCAATGTAAGGCCAAAATTTGTGTCTGAAATGTTTCGTTTACGTTTTCAAGCTAA
 CAATBOX1
 ATAAAAACATAGGAATTATATAGTTTTGCTGGTGGCTTAGAACTTTGTCCAAA
 TATTCTAAAAAAAAACTTCATCCAAAATGGTGCTTAGTTTAATTTGTATACCTGCA
 ROOTMOTIFTAPOX
 CCATGCTATTCTCTGGCCTTGTCTTTTGCGCATCTATCCATGCCTATGGATGATC
 GCAGGCTCGCAGCCACGCCACGCAATTCATTCTTAATCACCATTTGCTTGACATC
 CAATBOX1 MYCCONSENSUSAT
 CAATGTCCTCTGCACCACCACTTGCGCACCCTACACACCGCCATTTGATACGCC
 CAATBOX1 GATA BOX
 AAGATCCCAAGCTAAAATAACACCCAATGATCATATGAAAACAAGCGTGAGTGG
 CAATBOX1 MYCCONSENSUSAT
 AAGCCAGCCCATGCAGCGATCTTGGCCATTTGCGGAGCCAACCGAAGCCCGTGCA
 MYCCONSENSUSAT
 CAAAATATTGAGACCGTATAAGGGAAAACACTAGTTATACGCAATGTCCATAA
 ROOTMOTIFTAPOX CAATBOX1
 TAATCCAGATCGACTCTTCTTAACCGGGTTACATGAACGCTATTGCTGCTAGTGC
 OSE2ROOTNODULE MYCATRD22 CAATBOX1
 ACCGATTTCTTAAATCCCAAGGCTCGACTATAAATACCCCTGGTATTGACACCGT
 TATABOX1
 GATCAAAGCATCGCAAACAAGCTAAAGAgctctctaactacattgattagagtgatctgcgctagaagaggc
 tagcttgatcgagca3'

Figura 6 – Sequência de 1139 pb correspondente à região promotora do candidato SCCRT1004A07, com indicação dos elementos de regulação *cis* putativos, segundo análise no banco de dados PLACE. Elementos de regulação com localização esperada estão destacados em cinza. Região 5' não traduzida em letras minúsculas.

5'TGACGCATGGAGCATTAAATATAGGTAATAAATAACTAATTGCA^{CAAT}TTATC
 CAATBOX1
 TGAAATGTCGAGACGA^{ATCTTT}TGAGCCATTGTTGGACAAATTTTGCCAAATAAC
 OSE1ROOTNODULE
 AACGAAAGTGCTACAGAAGTTTTTCCCAAGAATTTTGGGATCTAAACAAGAGGT
 AATCTTGTTGCCTCAACTACCCCAAATATAGGATGTTCA^{GGATT}CCTGTCG^C
 ARRIAT
^{AAT}CCCTGACCTGACCTGACCTTCTTCTTAACCGCTTATATCACAGCTTTA^{CAAT}
 CAATBOX1 CAATBOX1
 GAATGATGTATCACTACAGAACTCTCAGTATGAACGCGAGGGGTGTAA^{CAAT}TTT
 CAATBOX1
 AATCCAGGTGAT^{CTCTT}ACTCGGTCA^{GATA}CTCAGGTCGAGGTCCGAGGAATTCC
 OSE2ROOTNODULE GATA BOX
 CCTTTTGTGCAGGAGAACCAAGTCCTATGAATGAAGCAGCAGCTCGGTAATGAT
 CC^{GCCGAC}TCCGCGACTCCTAGCATAGAAATAGTATTC^{CTCTT}AATACTATGTTGT
 DRECRTCOREAT OSE2ROOTNODULE
 AATTAGTAACAACAAAACAAGAACCACGCCACGGAAGAATGGTGAAAAAAAAAAT
 TCTTTGCTAATGTACTATTCATAAATTTGA^{AGATT}TTGCATAGATGCAGGGTAGAA
 ARRIAT
 ATAAAGGAT^{CGATT}CAGACACCGCCAT^{TGATT}TGTTTAGGCATGAGATGAGAATT
 ARRIAT ARRIAT
 GA^{GATA}ACATATATCTGCTCCAAGGTCTTGTTCTCCTTGCTGTTTGATGGTGTATC
 GATA BOX
 CTAACGTGGCCGGCCTAAACAACCA^{CAAT}TCCACAG^{CAAT}TTAGCGAGTTAGGG
 CAATBOX1 CAATBOX1
 CGTTGGTTCGGCCAATATCAGCCACAAAACACGA^{CCGAAA}TTTAAATTAT^{CAAT}
 LTRE1HVBLT49 CAATBOX1
 CATGTGGTGATCATTGCACACCGCCATA^{ATATT}GTAATGC^{ATATT}TGAGGCAGG
 ROOTMOTIFTAPOX1 ROOTMOTIFTAPOX1
 GCACCAGGGCCATTAGCGCCTTATGATGTG^{TATTTAA}GGAGACTGAGCTGAAGGA
 TATABOXOSPAL
 ACTCTCGC^{atcagcctgata}agcaatagccatcttctctgaattcaactcagtgtctcagccaagggtgaaagcctgaaatac
 GATA BOX
 cgtcagagaagaaaaag3'

Figura 7 – Sequência de 1040 pb correspondente à região promotora do candidato SCBGRT1052E01, com indicação dos elementos de regulação *cis* putativos, segundo análise no banco de dados PLACE. Elementos de regulação com localização esperada estão destacados em cinza. Região 5' não traduzida em letras

5.7 Clonagem em vetor de expressão para transformação de plantas

Foram amplificados dois fragmentos para SCBGRT1052E01 (denominados C1 e L1) e dois para o candidato SCCCRT1004A07 (denominados C2 e L2) (Tabela 5). O oligonucleotídeo *reverse* foi o mesmo para a amplificação dos dois fragmentos de cada candidato, variando somente o oligonucleotídeo *forward* utilizado. Os quatro fragmentos gerados foram digeridos e ligados aos vetores pCAMBIA-1381 e pCAMBIA-1381Z, formando cassetes de expressão como os ilustrados na Figura 8.

Adicionalmente foi realizado o seqüenciamento dos quatro fragmentos promotores clonados, a partir dos vetores pCAMBIA, com atenção especial à região de junção do promotor em análise ao gene repórter GUS, sendo que todas as construções apresentaram as seqüências esperadas.

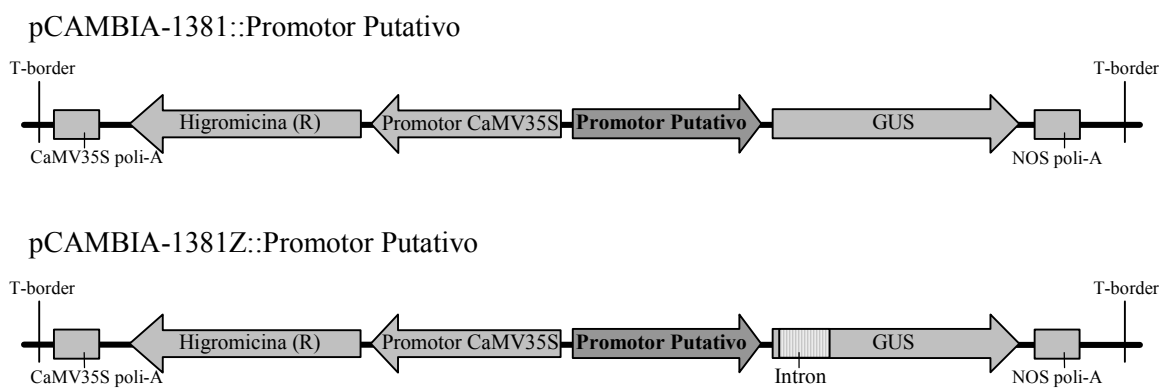


Figura 8 – Esquema representativo do cassete de expressão dos vetores pCAMBIA-1381 e pCAMBIA-1381Z contendo fragmentos promotores putativos.

5.8 Ensaios de expressão transiente em cana-de-açúcar

Os ensaios de expressão transiente foram realizados empregando-se plântulas de cana-de-açúcar provenientes de cultura *in vitro*. Depois de bombardeadas, as plântulas foram mantidas por 48 horas em câmara climatizada e então submetidas ao ensaio histoquímico. Nesse caso, somente as plântulas bombardeadas com o plasmídeo controle apresentaram pontos azuis tanto na parte aérea quanto na raiz (Figura 9; A e B). Plântulas que receberam plasmídeos contendo o fragmento menor da seqüência promotora do candidato SCCCRT1004A07 apresentaram poucos pontos restritos à parte aérea (Figura 9; C e D). As demais construções testadas não geraram pontos azuis correspondentes à atividade GUS (Figura 9; E e F).

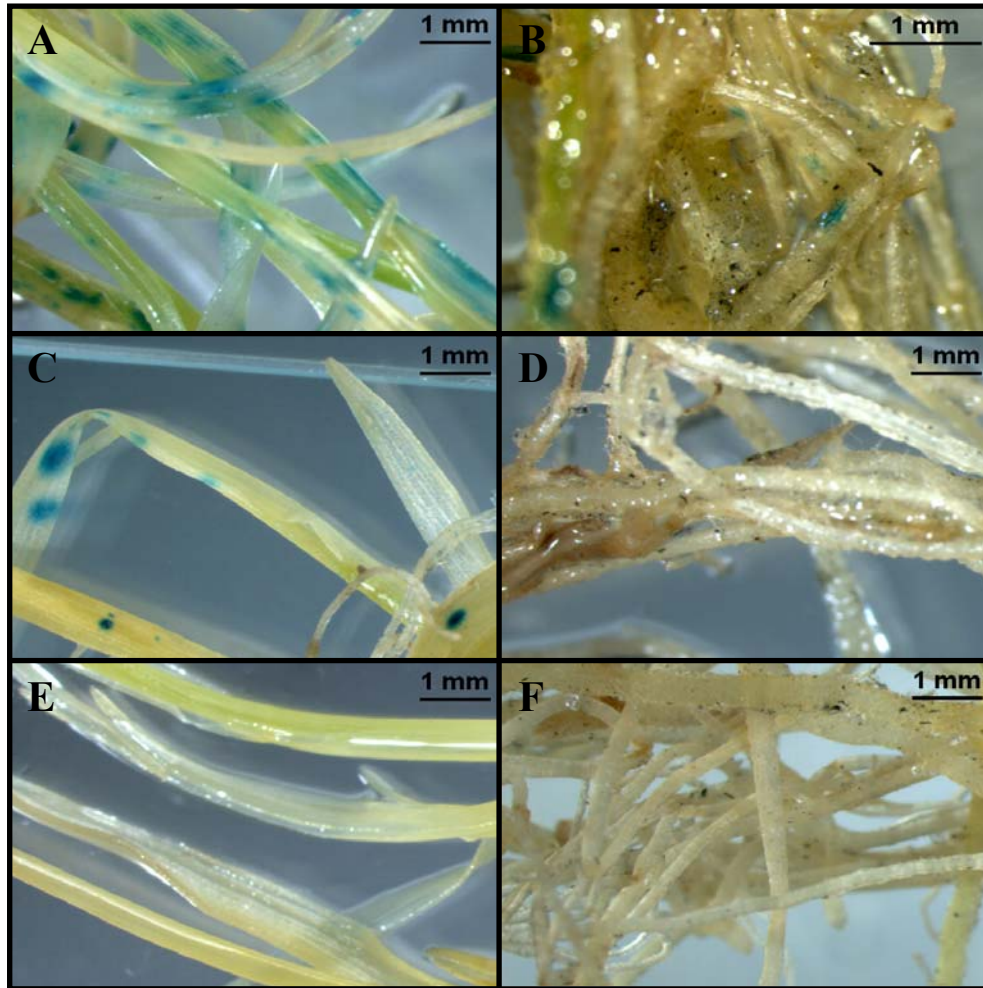


Figura 9 – Ensaio de expressão transitória em plântulas de cana-de-açúcar empregando o gene GUS sob controle de seqüências promotoras putativas específicas de raiz. A e B – controle positivo (*Ubi-1::GUS*); C e D – fragmento C2::GUS; E e F – demais construções; A, C e E – parte aérea; B, D e F – raízes.



Figura 10 – Análise histoquímica da atividade GUS nos órgãos/tecidos de plantas de cana transformadas com cassete de expressão contendo as seqüências promotoras putativas C1 e L1 específicas de raiz. A – folha; B – raiz e C – bainha da folha.

5.9 Análise funcional dos promotores em plantas de cana-de-açúcar

5.9.1 Análise das plantas transgênicas obtidas

Após a transformação estável, os explantes de cana-de-açúcar foram selecionados quanto à resistência a *geneticin*, o que resultou na regeneração de 115 plantas resistentes, nove delas transformadas com a versão menor (C1) e 106 com a versão maior (L1) da seqüência promotora isolada para o candidato SCBGRT1052E01. Para o candidato SCCCRT1004A07, algumas plantas foram regeneradas, mas ainda não foram analisadas.

Com base na presença do gene GUS evidenciada por PCR, foram selecionadas duas plantas contendo o fragmento menor (C1) e 24 contendo o fragmento maior (L1) da região promotora do candidato SCBGRT1052E01 para futuras análises. Todas as plantas eram da variedade SP80-3280.

A partir de tais plantas foram coletadas amostras de raiz, folha e bainha da folha para avaliação da atividade de GUS através de ensaio histoquímico. Entretanto, após o ensaio histoquímico, nenhuma coloração correspondente à atividade GUS foi observada, em nenhuma das plantas testadas, em qualquer órgão/tecido (Figura 10).

5.9.2 Análise da expressão do gene GUS por RT-PCR

Para verificar se o gene GUS estava sendo transcrito nas plantas de cana transformadas, optou-se por utilizar a técnica de RT-PCR por sua sensibilidade. Para tal, extraiu-se RNA total de amostras de raiz, folha e entrenó de duas plantas positivas para o fragmento C1 e de 10 para o fragmento L1 do candidato SCBGRT1052E01. Os RNAs foram quantificados, tratados com *DNase I* e submetidos a RT-PCR usando oligonucleotídeos dirigidos para uma região do gene GUS. As amplificações geraram produtos de tamanho esperado em todos os órgãos/tecidos analisados (Figura 11; GUS), confirmando a expressão de GUS. Não foram observados produtos de amplificação em alíquotas de RNA total tratado indicando ausência de DNA genômico. Como um teste adicional para checar uma possível contaminação com DNA genômico, foi realizada a amplificação do fragmento menor (C2) do promotor do candidato SCCCRT1004A07 em tais amostras. Como pode ser observado na Figura 11 (C2), só foi detectada amplificação em três das 12 plantas testadas, confirmando mais uma vez que a grande maioria dos cDNAs não continha DNA genômico. Curiosamente foi observada nas amostras de cDNA livres de DNA analisadas anteriormente, a amplificação da região promotora inserida, indicando que a mesma estava sendo transcrita em uma das plantas contendo a versão C1 e em cinco das dez plantas contendo a versão L1 (Figura 11; C1-GUS).

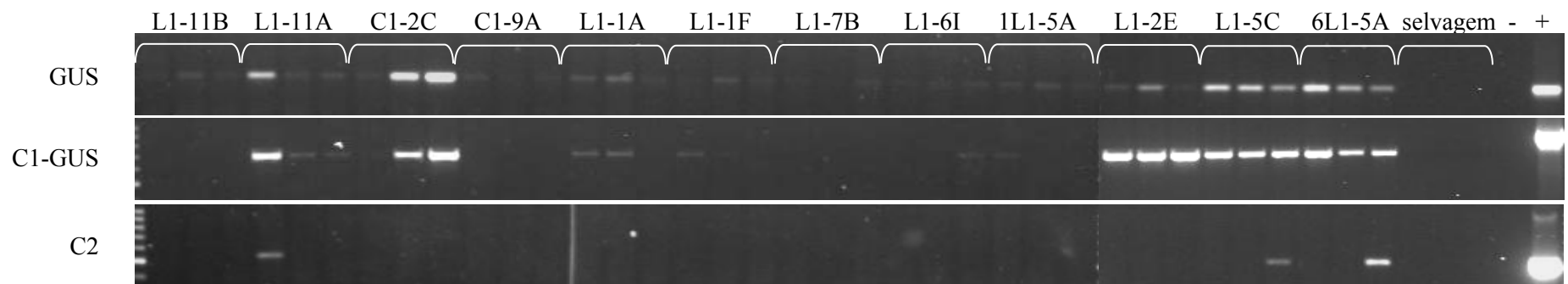


Figura 11 – Resultado da amplificação de cDNAs de folha, raiz e entrenó de plantas de cana-de-açúcar transformadas com o plasmídeo pCAMBIA-1381Z contendo as versões C1 e L1 do candidato com expressão específica em raiz SCBGRT1052E01. Foram analisadas duas plantas contendo o fragmento C1 e 10 plantas contendo o fragmento L1 com oligonucleotídeos GUS F e R, GUS R e SCBGRT1052E01/C1 F e SCCCRT1004A07/C2 F e R.

5.10 Análise funcional dos promotores em plantas de tabaco

Discos de folha de tabaco foram transformados com os cassetes de expressão contendo a versão L1 do candidato SCBGRT1052E01 e a versão C2 do candidato SCCCRT1004A07. Nenhuma planta transformada foi obtida para a construção contendo a versão L1, enquanto que para a versão C2 foram obtidas três diferentes linhagens transformadas.

O ensaio histoquímico realizado usando órgãos/tecidos extraídos de plantas da geração R0 das três diferentes linhagens demonstrou a presença de atividade GUS em todos os órgãos/tecidos testados (raiz, folha, pecíolo e caule) (Figura 12).

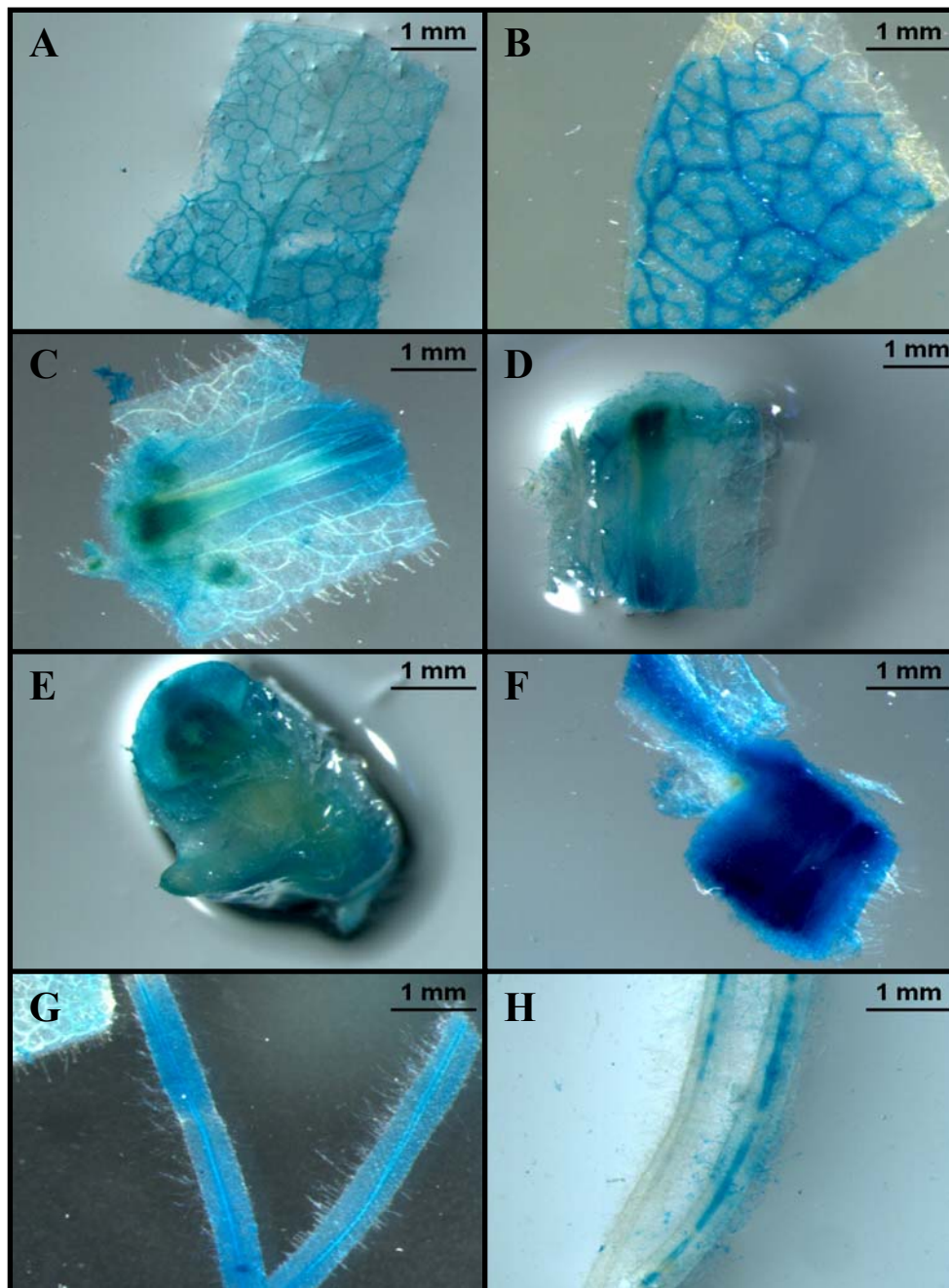


Figura 12 – Ensaio histoquímico da atividade GUS em órgãos/tecidos de plântulas de tabaco transformadas com a versão C2. Tecidos da planta controle 35S::GUS (A, C, E e G); Tecidos das plantas transformadas com a versão C2 do candidato SCCART1004A07 (B, D, F e H). A e B – folha; C e D – pecíolo; E e F – caule e G e H – raiz.



6. Discussão

6.1 Clusters tecido-específicos

Candidatos tecido-específicos foram selecionados no banco SUCEST a partir de uma análise *in silico*, que indicou que aproximadamente 1,5% (667/~40000) do total de *clusters* do referido banco eram formados por *reads* provenientes de uma única biblioteca representando um determinado órgão/tecido. Segundo dados publicados por Vettore et al. (2001), 8,6% dos *clusters* do banco SUCEST são compostos por mais de um *read* e expressos em somente uma biblioteca, como os selecionados para este trabalho. A diferença observada na quantidade esperada de *clusters* tecido-específicos (8,6 – 1,5%) é reflexo dos rígidos parâmetros utilizados durante a análise apresentada nesse trabalho, que buscou minimizar o número de *clusters* tecido-específicos falso-positivos após a validação.

A expressão tecido-específica dos 29 *clusters* selecionados *in silico* foi validada biologicamente por RT-PCR. Foi possível verificar que a maioria dos candidatos apresentava expressão em todos os tecidos analisados e que 13,8% (4/29) dos *clusters* selecionados eram realmente tecido-específicos (Figura 2). Em trabalho semelhante de validação de ESTs tecido-específicos *in silico* em eucalipto, Sasaki (comunicação pessoal) obteve uma taxa de 8,6% de candidatos validados, demonstrando que, tanto para cana-de-açúcar quanto para eucalipto, a maioria dos *clusters*, apesar de evidenciarem uma expressão tecido-específica *in silico*, na verdade são expressos em mais de um tecido. As análises *in silico*, como as realizadas por Sasaki e no presente trabalho, são baseadas no banco de dados gerados pelos projetos de seqüenciamento, no caso, FORESTs (*Eucalyptus Genome Project Consortium*) e SUCEST, e de acordo com a metodologia utilizada para a construção das bibliotecas de cDNAs desses projetos (Vicentini et al., 2005; Vettore et al., 2001), a composição final dos *clusters* pode ser reflexo da abundância dos mRNAs presentes em dado tecido. Assim, *clusters* que aparentam ter expressão tecido-específica *in*

silico, na verdade também seriam compostos por *reads* de mRNAs raros de outros tecidos que não foram amostrados na construção das bibliotecas, fato que durante a validação por RT-PCR, resulta em *clusters* com expressão preferencial, mas não específica em um determinado órgão/tecido.

Considerando que existem muito poucos genes caracterizados em cana-de-açúcar, que 38,5% das seqüências geradas pelo SUCEST podem representar novos genes (Vettore et al., 2001) e que 37,9% (11/29) dos *clusters* selecionados para validação neste trabalho não apresenta similaridade com seqüências depositadas no *GenBank*, a taxa de validação obtida no presente trabalho (13,8%) pode ser considerada satisfatória. Aliás, porcentagens tão semelhantes de *clusters* que não apresentaram similaridade no *GenBank*, 37,9% entre os selecionados para este trabalho e 38,5% do total gerado pelo SUCEST, demonstram que a seleção por *clusters* com expressão tecido-específica *in silico* parece não ter influenciado o número de *clusters* sem similaridade, indicando não haver relação entre expressão tecido-específica *in silico* e genes conhecidos. Com relação aos *clusters* com expressão tecido-específica validada por RT-PCR, 25% (1/4) não apresentou similaridade com seqüências do *GenBank*, o que parece indicar que realmente não há relação entre *clusters* tecido-específicos e seqüências conhecidas.

Dos quatro candidatos validados no presente trabalho com padrão de expressão tecido-específico, somente os candidatos SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01 apresentaram seqüências deduzidas de aminoácidos com similaridade a proteínas com regiões N-terminais conhecidas, o que possibilitou a busca direta pelas regiões promotoras. Dessa forma, foi priorizado o estudo destes dois candidatos.

6.1.1 O candidato SCCCRT1004A07

A seqüência do candidato com expressão raiz-específica SCCCRT1004A07 apresentou alta similaridade a uma proteína específica de raiz de arroz. Analisando outras seqüências similares, foi possível identificar que este candidato codifica uma proteína transportadora de lipídio (*Lipid Transfer Protein* – LTP). As LTPs são proteínas pequenas, básicas e abundantes (4% do total de proteínas solúveis) em plantas superiores (Kader, 1996). Sua principal função é o transporte de fosfolipídios entre membranas, mas também atuam na formação da cutina, por transportar monômeros *acyl* (da biosíntese de cutina), na defesa contra patógenos, inibindo o crescimento de fungos e bactérias e na resposta a desidratação, por participar do depósito de cera cuticular (Kader, 1996; Cameron et al., 2006).

As LTPs são conhecidas em várias espécies vegetais e apresentam variado padrão de expressão (Kader, 1996; José-Estanyol et al., 2004). Arondel et al. (2000) caracterizaram a família de LTPs em *Arabidopsis*, a qual é formada por pelo menos 15 genes, todos expressos nas flores mas não na raiz. Em trigo, Boutrot et al. (2007) identificaram nove cDNAs codificando diferentes LTPs e por RT-PCR observaram um padrão de expressão variável entre estes genes, sendo um deles (*TaLtp7.2a*) expresso somente no início da maturação da semente e depois da germinação na raiz. Fazendo uma busca por ESTs similares a SCCCRT1004A07 no banco SUCEST, foram identificados *clusters* codificando pelo menos 11 proteínas diferentes, que segundo análise *in silico*, apresentam padrão de expressão variável.

A expressão raiz-específica de SCCCRT1004A07 foi confirmada por PCR em tempo real, a qual evidenciou uma pequena variação da expressão entre as diferentes fases de desenvolvimento de raiz analisadas (Figura 5). LTPs específicas de raiz foram identificadas em arroz (RCc2 e RCc3, Xu et al., 1995) e feijão (PVR3, Choi et al., 1996).

A busca por seqüências similares à seqüência deduzida de aminoácidos deste candidato em bancos de dados resultou em 84 seqüências com pelo menos 40% de similaridade. Todas estas seqüências eram completas e assim como a seqüência de SCCCRT1004A07, continham a assinatura de cisteínas (2/3-C-8-C-12/15-CC-19-C-1-C-21/23-C-13-C-4/8), característica das LTPs. A árvore filogenética gerada para estas 84 seqüências (Figura 3) demonstrou que este grupo de LTPs é muito diverso, uma vez que seqüências de uma espécie aparecem espalhadas pela árvore, e conservado entre as espécies. Assim, as seqüências de espécies diferentes permaneceram agrupadas, indicando que as diferenças observadas são maiores entre seqüências da mesma espécie do que entre seqüências de espécies diferentes, inclusive para cana-de-açúcar. Essa conservação também foi observada na estrutura da proteína.

A estrutura parcial da proteína codificada pelo candidato SCCCRT1004A07 (Figura 4A-C) está de acordo com a literatura, isto é, é composta por oito resíduos de cisteína que formam quatro pontes dissulfeto, que estabilizam quatro alfa-hélices, que por sua vez cercam uma cavidade hidrofóbica (Boutrot et al., 2005). A estrutura terciária parcial gerada para o alinhamento das 84 seqüências similares à seqüência de SCCCRT1004A07 foi muito semelhante àquela gerada somente com a seqüência do candidato, demonstrando que se trata de uma estrutura muito conservada entre as LTPs (Figura 4). Tal conservação é observada principalmente junto à região da

cavidade hidrofóbica (Figura 4D-F, rosa). A presença de tantos aminoácidos conservados indica que muito provavelmente a região da cavidade hidrofóbica deve ser aquela relacionada ao transporte de lipídios.

6.1.2 O candidato SCBGRT1052E01

A seqüência do candidato SCBGRT1052E01 apresentou alta similaridade (92%) à seqüência de uma aquaporina de milho do tipo TIP2;3 específica de raiz (ZmTIP2;3, Lopez et al., 2004). Apesar de ainda não terem sido caracterizadas em cana-de-açúcar, as aquaporinas são bem conhecidas em muitas espécies vegetais (Chaumont et al., 2001; Johanson et al. 2001; Sakurai et al., 2005).

As aquaporinas fazem parte de uma superfamília de proteínas intrínsecas de membrana, denominada MIP (*major intrinsic proteins*), que é subdividida em quatro classes: (1) TIPs (*tonoplast intrinsic proteins*), abundantes na membrana vacuolar; (2) PIPs (*plasma membrane intrinsic proteins*), abundantes em membranas plasmáticas; (3) NIPs (*Nodulin-26-like intrinsic proteins*), presentes em membranas de nódulos de fixação simbiótica de nitrogênio e (4) SIPs (*small basic intrinsic proteins*), presentes na membrana do retículo endoplasmático (Luu & Maurel, 2005; Kaldenhoff & Fisher, 2006).

A principal função das aquaporinas é facilitar o transporte de água, mas esses canais também são utilizados para o transporte de glicerol, gás carbônico e uréia (Kaldenhoff & Fisher, 2006). A regulação das aquaporinas pode ser em nível transcricional, por hormônios (ABA e giberelina) e estresses (frio, seca, salinidade e luz) ou pós-traducional, por fosforilação, glicosilação e proteólise (Johansson et al., 2000).

Foram identificados 33 genes de aquaporinas em arroz (Sakurai et al., 2005), 33 em milho (Chaumont et al., 2001) e 35 em *Arabidopsis* (Johanson et al., 2001), com padrão de expressão variável em diferentes órgãos/tecidos e fases do desenvolvimento. Em milho, os cDNAs que formaram os ZmTIP2s (inclusive ZmTIP2-3) foram amostrados em sua grande maioria em bibliotecas de raiz, enquanto os ZmNIPs e ZmSIPs foram formados predominantemente por cDNAs de bibliotecas de tecidos reprodutivos (Chaumont et al., 2001). Em arroz também foi observada uma diferença de expressão entre raiz e folha para alguns OsPIP2s e OsTIPs (OsTIP2;1 é a mais próxima filogeneticamente de ZmTIP2-3), mas os genes codificando OsNIPs e OsSIPs não foram preferencialmente expressos (Sakurai et al., 2005). Em *Arabidopsis*, alguns AtTIPs foram mais expressos em semente/embrião e raiz, enquanto que alguns AtNIPs parecem ser exclusivos de raiz (Johanson et al., 2001). Papini-Terzi et al. (2005), utilizando lâminas de *microarray* de cDNA, identificaram três *clusters* do banco SUCEST diferencialmente expressos em raiz (SCSBST3096E10, SCEQRT2100B02 e SCCCLR1024C03) que correspondem a TIPs. Vicentini et al. (2005) identificaram um TIP (EGEPRT3362H10) com expressão raiz-específica em eucalipto por análise *in silico* e validação por RT-PCR. Estes dados sugerem que alguns TIPs têm padrão de expressão conservado e específico para raiz, entre diferentes espécies vegetais.

A expressão raiz-específica de SCBGRT1052E01 foi confirmada por PCR em tempo real, que demonstrou ainda expressão levemente maior deste candidato em raízes mais jovens (Figura 5). Algumas aquaporinas já foram isoladas e caracterizadas com expressão específica em raiz. Mizutani et al. (2006) detectaram a proteína da aquaporina NIP2;1 de *Arabidopsis* somente em amostras de raiz, confirmando os dados obtidos por Zimmermann et al. (2004). Conkling et al. (1990) identificaram quatro genes de tabaco

expressos unicamente em raiz, um destes, RB7 (ou TobRB7-5A), apresentou alta similaridade a seqüências de aquaporinas. Segundo Johanson et al. (2001) TobRB7-5A é uma aquaporina do tipo TIP2;2.

6.2 Isolamento de seqüências promotoras e análise funcional

A técnica de TAIL-PCR utilizada para o isolamento da região promotora foi eficiente, produzindo fragmentos localizados a 5' do oligonucleotídeo gene-específico. A característica que diferencia esta técnica é a utilização de oligonucleotídeos randômicos ou degenerados, que possibilita a amplificação de fragmentos em regiões desconhecidas do genoma, porém como a presença de um sítio para o oligonucleotídeo randômico testado é casual, torna-se necessário, em alguns casos, testes com dezenas de oligonucleotídeos até que se encontre um que possibilite a amplificação de um fragmento e a repetição deste processo algumas vezes até que o tamanho da região promotora isolada seja o desejado. Para o candidato SCCCRT1004A07 foi necessária a amplificação de três fragmentos para que se atingisse cerca de 1100 pb a partir do oligonucleotídeo gene-específico empregado, sendo testados 30, 36 e 18 oligonucleotídeos randômicos para amplificação do primeiro, segundo e terceiro fragmentos, respectivamente. Para o candidato SCBGRT1052E01 foram testados 18 oligonucleotídeos para amplificação de cada um dos dois fragmentos, que juntos formaram uma seqüência de aproximadamente 1000 pb. O maior fragmento amplificado apresentou cerca de 800 pb, incluindo a região de sobreposição com o EST, e foi amplificado para o candidato SCCCRT1004A07 após teste com 18 oligonucleotídeos randômicos. Terauchi & Kahl (2000) afirmaram ter obtido fragmentos de até 1014 pb testando 16 oligonucleotídeos randômicos para o isolamento do promotor do gene da

phenylalanine ammonia lyase (Pal) de *Dioscorea bulbifera*. Pompermayer (2004) obteve fragmentos de até 1100 pb testando sete oligonucleotídeos degenerados e cinco randômicos para o isolamento da região 5' do gene *hevein-like protein* de cana-de-açúcar. Analisando os resultados obtidos no presente trabalho e nestes outros, é possível notar que, de maneira geral, o número de oligonucleotídeos testados para amplificação de um fragmento foi menor quando oligos degenerados foram utilizados, tornando o processo de isolamento da região promotora mais rápida.

6.2.1 Região promotora de SCCCRT1004A07

A região promotora isolada para este candidato foi de 1139 pb incluindo uma região 5' UTR de 50 pb, que é menor que aquela observada para o candidato SCCCRT1052E01 (96 pb). Uma pequena região 5' UTR, de 80 pb, também foi observada por Federico et al. (2005) para o gene *Ltp6* de cevada.

Na região amplificada foram observados muitos elementos de regulação (Figura 6). O elemento *ROOTMOTIFTAPOXI* foi previamente identificado em regiões promotoras do gene *rolD* de *Agrobacterium rhizogenes* (Elmayan & Tepfer, 1995) e do gene *TTG2* de *Arabidopsis thaliana* (Johnson et al., 2002) e parece estar associado a expressão em raiz.

Já o elemento *ARRIAT* observado na sequência promotora deste candidato, foi encontrado em genes reguladores de resposta (ARRs) a estímulos externos (Sakai et al., 2000), enquanto os elementos *OSE2ROOTNODULE* e '*GAAGAG*' foram observados em promotores de genes com função relacionada à fixação simbiótica de

nitrogênio. Apesar de gramíneas, inclusive cana-de-açúcar, não formarem nódulos de fixação de nitrogênio em suas raízes como as leguminosas, sabe-se que as mesmas são capazes de se associar a bactérias fixadoras de nitrogênio, tais como *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia vietnamiensis* e *B. kururiensis* (Baldani & Baldani, 2005). Pode-se especular que o referido promotor seria modulado em resposta a tais bactérias fixadoras. Nesse contexto, a presença de *ARRIAT* no promotor de um gene de haemoglobina não simbiótica em arroz (Ross et al., 2004), outra gramínea que não possui nódulos de fixação de nitrogênio, parece indicar que os elementos encontrados na sequência promotora do candidato SCCCRT1004A07 de cana-de-açúcar podem ser sensíveis a essas associações.

Outros elementos regulatórios encontrados na sequência promotora de SCCCRT1004A07 foram *MYCATERD1*, *MYCATRD22* e *MYCCONSENSUSAT*, que estão relacionados à resposta a estresse abiótico. *MYCATERD1* é o sítio de reconhecimento dos fatores de transcrição NAC (Tran et al., 2004), envolvidos na resposta primária a desidratação em *Arabidopsis*, enquanto *MYCATRD22* e *MYCCONSENSUSAT* possuem o domínio MYC e foram encontrados em promotores de genes que respondem a seca e frio (Abe et al., 1997; Chinnusamy et al., 2003). Os fatores de transcrição NAC e MYC atuam em vias de resposta a seca e salinidade dependentes de ABA e podem ser influenciados por estímulos externos (Figura 1). Seki et al. (2001) observaram em experimentos de *microarray* de cDNA, transcritos de uma LTP induzidos por seca e frio em *Arabidopsis*.

Também foi observado um elemento *TATA Box* localizado à -47 pb do sítio de início de transcrição e um elemento *CAAT Box* à -94 pb (Figura 6, em destaque), indicando a existência de sítios conservados de ligação para fatores gerais de transcrição e que essa deve ser uma sequência funcional reconhecida pela RNA polimerase.

Os resultados da análise funcional por transformação estável de tabaco com a versão C2 comprovaram que uma região de apenas 516 pb do promotor do candidato SCCCRT1004A07 foi capaz de dirigir de maneira estável a expressão do gene GUS (Figura 12), embora neste caso, em todos os órgãos analisados. Uma vez que os ensaios transientes utilizando esse promotor em plântulas de cana-de-açúcar indicaram que o mesmo é capaz de determinar a expressão do gene repórter pelo menos na parte aérea da planta (Figura 9), pode-se concluir que essa região é ativa do ponto de vista transcricional. O padrão ubíquo de expressão observado pode ser sido causado pela ausência dos elementos regulatórios que determinariam a expressão tecido-específica nas espécies testadas. Apesar desta seqüência não ser muito extensa, acreditava-se que os elementos necessários à regulação da expressão de maneira específica poderiam estar nela contidos, já que promotores com tamanhos menores foram descritos como sendo capazes de dirigir a expressão no tecido esperado. Federico et al. (2005), por exemplo, caracterizaram o promotor do gene *Ltp6* de cevada e observaram que uma construção contendo 192 pb iniciais da região promotora e a região 5' UTR (80 pb) foi capaz determinar a expressão tecido-específica em embriões e coleóptilos. Opsahl-Sorteberg et al. (2004) identificaram no promotor do gene *HvLTP2* de cevada um fragmento de 49 pb, localizado a 162 pb do sítio de início de transcrição, capaz de dirigir a expressão para células da aleurona de arroz. Por outro lado, Xu et al. (1995) transformaram plantas de arroz com a região promotora do gene RCc2 (1656 pb), também uma LTP, fusionada a GUS e observaram que a maioria das linhagens não apresentava atividade GUS devido a rearranjos ou ao elevado número de cópias inseridas. Nesse caso, apenas uma linhagem apresentou atividade GUS, mas não de maneira específica em raiz como esperado, apesar das análises indicarem que a inserção foi correta com as seqüências intactas. Os autores acreditam que nessa linhagem a ausência

do elemento responsável pela especificidade do promotor testado seria responsável pelo padrão não específico observado.

Com base nos resultados obtidos e nos dados da literatura, torna-se necessária a análise das plantas de cana-de-açúcar transformadas com o fragmento menor (C2) e talvez a transformação de plantas de cana-de-açúcar com o fragmento L2 para comprovar (ou não) a expressão tecido-específica dirigida por este promotor. Em paralelo, pretende-se avaliar a expressão de GUS dirigida por esta seqüência promotora (L2) em plantas de arroz transformadas estavelmente com o referido cassete de expressão. Nesse caso, possíveis efeitos dos mecanismos de silenciamento derivados da inserção dessa seqüência em cana-de-açúcar seriam minimizados, visto que tanto o silenciamento transcricional (TGS – *transcriptional gene silencing*) quanto o pós-transcricional (PTGS – *post-transcriptional gene silencing*) requerem homologia de seqüências (Kooter et al., 1999), o que no caso, espera-se que não venha a ocorrer com uma seqüência de cana-de-açúcar inserida em arroz.

O silenciamento gênico já foi observado em cana-de-açúcar. Wei et al. (2003) analisando cassetes de expressão contendo promotores de dois genes de poliubiquitina de cana-de-açúcar (*ubi4* e *ubi9*) e um de milho (*Ubi-1*) em fusão ao gene GUS e inseridos em arroz e cana-de-açúcar, observaram PTGS em todas as plantas de cana-de-açúcar regeneradas para todas as construções, de maneira inesperada.

6.2.2 Região promotora de SCBGRT1052E01

Foi isolada uma região promotora de 1040 pb para o candidato SCBGRT1052E01 que apresenta expressão específica em raiz. O ponto de início de transcrição foi determinado a somente 96 pb do códon de início de tradução.

Seqüências promotoras de outras aquaporinas já foram descritas, mas não em cana-de-açúcar. Yamamoto et al. (1991) caracterizaram o promotor do gene *TobRB7*, que codifica uma TIP2;2 específica de raiz e demonstraram que este gene também possui uma pequena região 5'UTR de 76 pb e que um fragmento de 636 pb a partir do sítio de início de transcrição foi capaz de dirigir a expressão de maneira específica em raiz de tabaco. Yamada et al. (1997) isolaram a região promotora do gene *MipB* que codifica uma aquaporina em *Mesembryanthemum crystallinum* e observaram que seu padrão de expressão é mantido em tabaco, sendo o mesmo expresso em raízes de plântulas recém germinadas, meristema apical de plantas jovens, tricomas das folhas, sistema vascular e flores.

A análise no banco PLACE revelou a existência de vários elementos regulatórios putativos na seqüência promotora do candidato SCBGRT1052E01 (Figura 7), alguns relacionados à resposta ao estresse hídrico, como *LTRE1HVBLT49* e *DRECRTCOREAT*. *LTRE1HVBLT49* estaria relacionado à resposta ao frio, tendo sido descrito por Dunn et al. (1998) no promotor do gene *blt4.9* de cevada, induzido por baixa temperatura, a -195 pb do sítio de início de tradução. No promotor de cana-de-açúcar este elemento foi encontrado a -229 do ATG iniciador, reforçando a hipótese de uma possível associação com a resposta à baixa temperatura. Nesse contexto, o elemento *DRECRTCOREAT* é reconhecido pelos fatores de transcrição OsDREB1A em arroz (Dubouzet et al., 2003), também envolvidos na resposta ao frio. A superexpressão de

OsDREB1A em *Arabidopsis* levou a superexpressão de genes induzidos por estresse e alvos de DREB1, gerando plantas com alta tolerância à seca, alta salinidade e congelamento (Dubouzet et al., 2003). A presença destes elementos indica, portanto, que a seqüência promotora em estudo seria modulada por baixas temperaturas, podendo também ser regulada em situações de estresse. De fato, a transcrição de genes que codificam aquaporinas seria induzida em resposta ao frio, seca e alta salinidade segundo estudos de *microarrays* em *Arabidopsis* (Seki et al., 2001; TIP2), cevada (Ueda et al., 2004; PIP1) e arroz (Kawasaki et al., 2001; MipH similar a uma PIP2) e de PCR em tempo real em *Arabidopsis* (Jang et al., 2004; PIP2;5).

Como mencionado anteriormente, no fragmento promotor deste candidato foram observados os elementos regulatórios *ROOTMOTIFTAPOXI*, presente da região promotora do gene *rolD* de *Agrobacterium rhizogenes* (Elmayan & Tepfer, 1995) bem como os elementos *OSE2ROOTNODULE* e *ARRIAT*, que estariam relacionados a genes envolvidos na fixação simbiótica de nitrogênio. Também foram observados os elementos *TATABOXOSPAL* e *CAAT Box*, a -26 pb e -118 pb do sítio de início de transcrição, respectivamente, posições muito próximas àquelas descritas em literatura (-30 e -100 pb), indicando que estes devem ser elementos reconhecidos pelos fatores gerais da transcrição em associação com a RNA polimerase.

Apesar de todas as análises funcionais realizadas, ainda não foi possível confirmar a atividade transcricional desta seqüência promotora putativa. Os ensaios de transformação estável em tabaco não regeneraram plantas transformadas. As tentativas de expressão transiente por biobalística em cana-de-açúcar não geraram expressão do gene repórter GUS (Figura 9, E-F), indicando que o mesmo não estaria sendo expresso ou não seria funcional. Essa última hipótese é corroborada pelo fato de não haver coloração histoquímica em tecidos de plantas de cana-de-açúcar estavelmente transformadas com os fragmentos C1 e L1. Segundo Wei et al. (2003), uma causa para a ausência de atividade da

proteína repórter em cana-de-açúcar seriam os baixos níveis de expressão dos transgenes inseridos por bombardeamento. Em alguns casos é necessária a seleção de centenas de linhagens transformantes para obtenção de uma capaz de apresentar altos níveis de expressão do transgene.

Para contornar esse problema, as plantas regeneradas foram avaliadas também por RT-PCR, que é mais sensível que a análise histoquímica. Desta vez foi possível confirmar que o gene GUS estava sendo transcrito, como observado na Figura 11 (GUS). Curiosamente, os ensaios de RT-PCR também indicaram que em algumas das linhagens transformadas a transcrição de parte da região promotora inserida estaria ocorrendo (Figura 11; C1-GUS). Nessas linhagens, essa transcrição anormal, embora difícil de explicar, também poderia produzir um mRNA não funcional, justificando a ausência de atividade de GUS. Wei et al. (2003) também observaram a transcrição do promotor *Ubi-1* em plantas de cana-de-açúcar transformadas por biobalística, o que, segundo os autores, poderia ser explicado pela ocorrência de rearranjos que possibilitariam que seqüências que não deveriam ser transcritas fossem inseridas após o transgene ou após promotores endógenos. Segundo Kohli et al. (1998), em um estudo de transformação de arroz por biobalística, foram observados rearranjos mesmo quando da inserção de somente uma ou duas cópias do transgene. Além disso, Wei et al. (2003) afirmaram que o bombardeamento frequentemente resulta em rearranjos, o que aumenta a probabilidade de produção de transcritos aberrantes.

Em função dos resultados obtidos, pretende-se realizar análise funcional da seqüência promotora deste candidato em arroz utilizando transformação por *A. tumefaciens*. Pretende-se dessa maneira evitar os rearranjos que podem ser provocados pelo bombardeamento e o silenciamento gênico que pode ser induzido pela homologia da seqüência inserida com uma seqüência endógena (Kooter et al., 1999).



7. Conclusões

✓ Foram identificados e validados quatro *clusters* com padrão de expressão órgão/tecido-específico em cana-de-açúcar (SCCCRT1004A07, SCBGRT1052E01 e SCCCRT2004C04 para raiz e SCCSD1003B01 para semente);

✓ Os candidatos SCCCRT1004A07 e SCBGRT1052E01 que codificam, respectivamente, uma proteína transportadora de lipídios e uma aquaporina, tiveram suas regiões promotoras amplificadas por TAIL-PCR e os sítios de início de transcrição determinados por RACE;

✓ Um fragmento de 516 pb da região promotora do candidato SCCCRT1004A07 é funcionalmente ativo e capaz de dirigir a expressão do gene repórter GUS;

✓ Em plantas de cana-de-açúcar transformadas de maneira estável com dois cassetes de expressão investigados foi observada a transcrição das seqüências promotoras junto o gene GUS.



8. Referências

- ABE, H.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; URAO, T.; IWASAKI, T.; HOSOKAWA, D.; SHINOZAKI, K. Role of Arabidopsis MYC and MYB Homologs in Drought and Abscisic Acid-Regulated Gene Expression. **Plant Cell**, v.9, p.1859-1868, 1997.
- AGRIBUS Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos, 2006. 521p.
- AL-JANABI, S.M.; HONEYCUTT, R.J.; MCCLELLAND, M.; SOBRAL, B.W.S. A Genetic Linkage Map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. **Genetics**, v.134, p.1249-1260, 1993.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v.215, p.403-410, 1990.
- AMALRAJ, V.A.; BALASUNDARAM, N. On the taxonomy of the members of 'Saccharum complex'. **Genet Resour Crop Ev**, v.53, p.35-41, 2006.
- ANFAVEA – Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. **Carta da ANFAVEA**. jun/07, n.253. Disponível em: <http://www.anfavea.com.br/cartas/Carta253.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2007.
- ARENCIBIA, A.; VÁSQUEZ, R.I.; PRIETO, D.; TÉLLEZ, P.; CARMONA, E.R.; COEGO, A.; HERNÁNDEZ, L.; DE LA RIVA, G.A.; SELMAN-HOUSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Mol Breeding**, v.3, p.247-255, 1997.
- ARONDEL, V.; VERGNOLLE, C.; CANTREL, C.; KADER, J.-C. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Sci**, v.157, p.1-12, 2000.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An Acad Bras Cienc**, v.77, p.549-579, 2005.
- BARROS, A.C.B.; MOURA, R.M.; PEDROSA, E.M.R.; MACEDO, M.E.A.; SILVA, I.P. Efeito da aplicação de Terbufos nas populações de três fitonematóides ectoparasitos em cana-de-açúcar. **Fitopatol Bras**, v.27, p.309-311, 2002.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; SANTOS, A.S.; MACHADO, L.A.; ALVES, S.B. Eficiência de Isolados de *Metarhizium anisopliae* no Controle de Cigarrinha-da-raiz da Cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: *Cercopidae*). **Arq Inst Biol**, v.70, p.309-314, 2003.
- BAUD, F.; PEBAY-PEYROULA, E.; COHEN-ADDAD, C.; ODANI, S.; LEHMANN, M.S. Crystal Structure of Hydrophobic Protein from Soybean; a Member of a New Cysteine-rich Family. **J Mol Biol**, v.231, p.877-887, 1993.
- BELANGER, F.C.; KRIZ, A.L. Molecular characterization of the major maize embryo globulin encoded by the *Glb1* gene. **Plant Physiol**, v.91, p.636-643, 1989.
- BI, R.-M.; JIA, H.-Y.; FENG, D.-S.; WANG, H.-G. Production and analysis of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) with improved insect resistance by the introduction of cowpea trypsin inhibitor gene. **Euphytica**, v.151, p.351-360, 2006.
- BOND, J.P.; MCGAWLEY, E.C.; HOY, J.W. Sugarcane growth as influenced by nematodes and *Pythium arrhenomanes*. **Nematropica**, v.34, p.245-256, 2004.
- BOND, J.P.; MCGAWLEY, E.C.; HOY, J.W. The impact of nematodes on sugarcane cultivars. **Nematropica**, v.34, p.235-243, 2004a.

- BÖRNKE, F.; HAJIREZAEI, M.; SONNEWALD, U. Potato tubers as bioreactors for palatinose production. **J Biotechnol**, v.96, p.119-124, 2002.
- BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; CHAGAS NETO, J.F.; OLIVEIRA, C.P.B. Associação do Parasitóide de Ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do Parasitóide Larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no Controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em Cana-de-açúcar. **An Soc Entomol Brasil**, v.28, p.491-496, 1999.
- BOUTROT, F.; GUIRAO, A.; ALARY, R.; JOUDRIER, P.; GAUTIER, M.-F. Wheat non-specific lipid transfer protein genes display a complex pattern of expression in developing seeds. **Biochem Biophys Acta**, v.1730, p.114-125, 2005.
- BOUTROT, F.; MEYNARD, D.; GUIDERDONI, E.; JOUDRIER, P.; GAUTIER, M.-F. The *Triticum aestivum* non-specific lipid transfer protein (*TaLtp*) gene family: comparative promoter activity of six *TaLtp* genes in transgenic rice. **Planta**, v.225, p.843-862, 2007.
- BRADFORD, K.J.; DEYNZE, A.V.; GUTTERSON, N.; PARROTT, W.; STRAUSS, S.H. Regulating transgenic crops sensibly: lessons from plant breeding, biotechnology and genomics. **Nat Biotechnol**, v.23, p.439-444, 2005.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. 309p.
- BUTLER, J.E.F.; KADONAGA, J.T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. **Gene Dev**, v.16, p.2583-2592, 2002.
- CAMERON, K.D.; TEECE, M.A.; SMART, L.B. Increased Accumulation of Cuticular Wax and Expression of Lipid Transfer Protein in Response to Periodic Drying Events in Leaves of Tree Tobacco. **Plant Physiol**, v.140, p.176-183, 2006.
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees. **Plant Mol Biol Rep**, v.11, p.113-116, 1993.
- CHAUMONT, F.; BARRIEU, F.; WOJCIK, E.; CHRISPEELS, M.J.; JUNG, R. Aquaporins Constitute a Large and Highly Divergent Protein Family in Maize. **Plant Physiol**, v.125, p.1206-1215, 2001.
- CHAVES, A.; PEDROSA, E.M.R.; MOURA, R.M. Efeito de terbufos em soqueira sobre fitonematóides ectoparasitos de cana-de-açúcar. **Fitopatol Bras**, v.28, p.195-198, 2003.
- CHEN, H.; AN, R.; TANG, J.-H.; CUI, X.-H.; HAO, F.-S.; CHEN, J.; WANG, X.-C. Over-expression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice. **Mol Breeding**, v.19, p.215-225, 2007.
- CHEN, X.; WANG, Z.; WANG, J.; WANG, M.; ZHAO, L.; WANG, G. Isolation and characterization of Brittle2 promoter from Zea Mays and its comparison with Ze19 promoter in transgenic tobacco plants. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.88, p.11-20, 2007a.
- CHINNUSAMY, V.; OHTA, M.; KANRAR, S.; LEE, B.-H.; HONG, X.; AGARWAL, M.; ZHU, J.-K. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. **Gene Dev**, v.17, p.1043-1054, 2003.
- CHOI, D.-W.; SONG, J.Y.; OH, M.-H.; LEE, J.S.; MOON, J.; SUH, S.W.; KIM, S.-G. Isolation of a root-specific cDNA encoding a ns-LTP-like protein from roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Plant Mol Biol**, v.30, p.1059-1066, 1996.

- CHONG, B.F.; BONNETT, G.D.; GLASSOP, D.; O'SHEA, M.G.; BRUMBLEY, S.M. Growth and metabolism in sugarcane are altered by the creation of a new hexose-phosphate sink. **Plant Biotechnol J**, v.5, p.240-253, 2007.
- CONKLING, M.A.; CHENG, C.-L.; YAMAMOTO, Y.T.; GOODMAN, H.M. Isolation of Transcriptionally Regulated Root-Specific Genes from Tobacco. **Plant Physiol**, v.93, p.1203-1211, 1990.
- CONVENÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS SOBRE MUDANÇAS CLIMÁTICAS. **Protocolo de Kyoto**. Disponível em: <http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php>. Acesso em: 29 maio 2007.
- CHRISTENSEN, A.H.; QUAIL, P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. **Transgenic Res**, v.5, p.213-218, 1996.
- D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, v.41, p.221-225, 1998.
- DEPARTAMENTO DE ENERGIA. **Programa de biomassa**. Estados Unidos. Disponível em: <<http://www.eere.energy.gov/biomass>>. Acesso em: 26 maio 2007.
- DEVIC, M.; ALBERT, S.; DELSENY, M.; ROSCOE, T.J. Efficient PCR walking on plant genomic DNA. **Plant Physiol Biochem**, v.35, p.1-9, 1997.
- DÍAZ-MARTÍN, J.; ALMOGUERA, C.; PRIETO-DAPENA, P.; ESPINOSA, J.M.; JORDANO, J. Functional Interaction between Two Transcription Factors Involved in the Developmental Regulation of a Small Heat Stress Protein Gene Promoter. **Plant Physiol**, v.139, p.1483-1494, 2005.
- DINARDO-MIRANDA, L.L.; COELHO, A.L.; FERREIRA, J.M.G. Influência da Época de Aplicação de Inseticidas no Controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae), na Qualidade e na Produtividade da Cana-de-açúcar. **Neotrop Entomol**, v.33, p.91-98, 2004.
- DINARDO-MIRANDA, L.L.; GARCIA, V.; PARAZZI, V.J. Efeito de Inseticidas no Controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) e de Nematóides Fitoparasitos na Qualidade Tecnológica e na Produtividade da Cana-de-Açúcar. **Neotrop Entomol**, v.31, p.609-614, 2002.
- DUBOUZET, J.G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E.G.; MIURA, S.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. **Plant J**, v.33, p.751-763, 2003.
- DUNN, M.A.; WHITE, A.J.; VURAL, S.; HUGHES, M.A. Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (*blt4.9*) from barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Mol Biol**, v.38, p.551-564, 1998.
- DRUMMOND, R.D.; GUIMARÃES, C.T.; FELIX, J.; NINAMANGO-CÁRDENAS, F.E.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E.; MENOSSI, M. Prospecting sugarcane genes involved in aluminum tolerance. **Genet Mol Biol**, v.24, p.221-230, 2001.
- ELLIOTT, A.R.; CAMPBELL, J.A.; BRETTELL, R.I.S.; GROF, C.P.L. Agrobacterium-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. **Aust J Plant Physiol**, v.25, p.739-743, 1998.

- ELMAYAN, T.; TEPFER, M. Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the *rolD* promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S² promoter. **Transgenic Res**, v.4, p.388-396, 1995.
- ENRÍQUEZ-OBREGÓN, G.A.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R.I.; PRIETO-SAMSONOV, D.L.; LA RIVA, G.A.; SELMAN-HOUSEIN, G. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**, v.206, p.20-27, 1998.
- FALCO, M.C.; MARBACH, P.A.S.; POMPERMAYER, P.; LOPES, F.C.C.; SILVA-FILHO, M.C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genet Mol Biol**, v.24, p.113-122, 2001.
- FALCO, M.C.; TULMANN NETO, A.; ULIAN, E.C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Rep**, v.19, p.1188-1194, 2000.
- FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiol Biochem**, v. 41, p.761-766, 2003.
- FEDERICO, M.L.; KAEPLER, H.F.; SKADSEN, R.W. The complex developmental expression of a novel stress-responsive barley *Ltp* gene is determined by a shortened promoter sequence. **Plant Mol Biol**, v.57, p.35-51, 2005.
- FERNANDES, C.; CORÁ, J.E.; BRAZ, L.T. Desempenho de substratos no cultivo do tomateiro do grupo cereja. **Hortic Bras**, v.24, p.42-46, 2006.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa, 1998, 220p.
- FEUILLET, C.; KELLER, B. Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution. **Ann Bot**, v.89, p.3-10, 2002.
- FIGUEIREDO, R.C.; BRITO, M.S.; FIGUEIREDO, L.H.M.; QUIAPIN, A.C.; VITORELLI, P.M.; SILVA, L.R.; SANTOS, R.V.; MOLFETTA, J.B.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.S. Dissecting the sugarcane expressed sequence tag (SUCEST) database: unraveling flower-specific genes. **Genet Mol Biol**, v.24, p.77-84, 2001.
- GEPTS, P. Crop Domestication as a Long-term Selection Experiment. **Plant Breed Rev**, v.24, p.1-44, 2004.
- GILBERT, R.A.; GALLO-MEAGHER, M.; COMSTOCK, J.C.; MILLER, J.D.; JAIN, M.; ABOUZID, A. Agronomic Evaluation of Sugarcane Lines Transformed for Resistance to *Sugarcane mosaic virus* Strain E. **Crop Sci**, v.45, p.2060-2067, 2005.
- GITTINS, J.R.; HILES, E.R.; PELLNY, T.K.; BIRICOLTI, S.; JAMES, D.J. The *Brassica napus extA* promoter: a novel alternative promoter to CaMV 35S for directing transgene expression to young stem tissues and load bearing regions of transgenic apple trees (*Malus pumila* Mill.). **Mol Breeding**, v.7, p.51-62, 2001.
- GOLDEMBERG, J. Ethanol for a Sustainable Energy Future. **Science**, v.315, p.808-810, 2007.
- GREEN, J.; VAIN, P.; FEARNEHOUGH, M.T.; WORLAND, B.; SNAPE, J.W.; ATKINSON, H.J. Analysis of the expression patterns of the *Arabidopsis thaliana* tubulin-1 and *Zea mays* ubiquitin-1 promoters in rice plants in association with nematode infection. **Physiol Mol Plant Pathol**, v.60, p.197-205, 2002.
-

- GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. Regulation of gene transcription. In: **Modern Genetic Analysis**. 3.ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2000. 20p.
- GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Curr Opin Plant Biol**, v.5, p.122-127, 2001.
- GUIMARÃES, C.T.; SILLS, G.R.; SOBRAL, B.W.S. Comparative mapping of Andropogoneae: *Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, p.14261-14266, 1997.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser**, v.41, p.95-98, 1999.
- HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. **Nucleic Acids Res**, v.27, p.297-300, 1999.
- HUANG, N.; WU, L.; NANDI, S.; BOWMAN, E.; HUANG, J.; SUTLIFF, T.; RODRIGUEZ, R.L. The tissue-specific activity of a rice beta-glucanase promoter (*Gns9*) is used to select rice transformantes. **Plant Sci**, v.161, p.589-595, 2001.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 14 maio 2007.
- IDO, O.T.; LIMA-NETO, V.C.; DAROS, E.; POSSAMAI, J.C.; ZAMBON, J.L.C.; WEBER, H.; OLIVEIRA, R.A. Incidência e Severidade da Ferrugem em Clones de Cana-de-Açúcar no Estado do Paraná. **Pesq Agropec Trop**, v.36, p.159-163, 2006.
- INOMOTO, M.M.; MOTTA, L.C.C.; BELUTI, D.B.; MACHADO, A.C.Z. Reação de Seis Adubos Verdes a *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*. **Nematol Bras**, v.30, p.39-44, 2006.
- IRVINE, J.E. *Saccharum* species as horticultural classes. **Theor Appl Genet**, v.98, p.186-194, 1999.
- ISHITANI, M.; RAO, I.; WENZL, P.; BEEBE, S.; TOHME, J. Integration of genomics approach with traditional breeding towards improving abiotic stress adaptation: drought and aluminum toxicity as case studies. **Field Crop Res**, v.90, p.35-45, 2004.
- JANG, I.-C.; CHOI, W.-B.; LEE, K.-H.; SONG, S.I.; NAHM, B.H.; KIM, J.-K. High-Level and Ubiquitous Expression of the Rice Cytochrome c Gene *OsCcl* and Its Promoter Activity in Transgenic Plants Provides a Useful Promoter for Transgenesis of Monocots. **Plant Physiol**, v.129, p. 1473-1481, 2002.
- JANG, J.Y.; KIM, D.G.; KIM, Y.O.; KIM, J.S.; KANG, H. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol Biol**, v.54, p.713-725, 2004.
- JOHANSON, U.; KARLSSON, M.; JOHANSSON, I.; GUSTAVSSON, S.; SJÖVALL, S.; FRAYSSE, L.; WEIG, A.R.; KJELLBOM, P. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. **Plant Physiol**, v.126, p.1358-1369, 2001.
- JOHANSSON, I.; KARLSSON, M.; JOHANSON, U.; LARSSON, C.; KJELLBOM, P. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. **Biochim Biophys Acta**, v.1465, p.324-342, 2000.

- JOHNSON, C.S.; KOLEVSKI, B.; SMYTH, D.R. *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a Trichome and Seed Coat Development Gene of Arabidopsis, Encodes a WRKY Transcription Factor. **Plant Cell**, v.14, p.1359-1375, 2002.
- JOSÉ-ESTANYOL, M.; GOMIS-RÜTH, F.X.; PUIGDOMÈNECH, P. The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins. **Plant Physiol Biochem**, v.42, p.355-365, 2004.
- KADER, J.-C. Lipid-Transfer Proteins in Plants. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v.47, p.627-54, 1996.
- KALDENHOFF, R.; FISCHER, M. Aquaporins in plants. **Acta Physiol**, v.187, p.169-176, 2006.
- KANZAKI, H.; NIRASAWA, S.; SAYITO, H.; ITO, M.; NISHIHARA, M.; TERAUCHI, R.; NAKAMURA, I. Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. **Theor Appl Genet**, v.105, p.809-814, 2002.
- KAWASAKI, S.; BORCHERT, C.; DEYHOLOS, M.; WANG, H.; BRAZILLE, S.; KAWAI, K.; GALBRAITH, D.; BOHNERT, H.J. Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice. **Plant Cell**, v.13, p.889-905, 2001.
- KAZAN, K.; GOULTER, K.C.; WAY, H.M.; MANNERS, J.M. Expressions of a pathogenesis-related peroxidase of *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco and canola and its effect on disease development. **Plant Sci**, v.136, p.207-217, 1998.
- KOHLI, A.; LEECH, M.; VAIN, P.; LAURIE, D.A.; CHRISTOU, P. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, p.7203-7208, 1998.
- KOOTER, J.M.; MATZKE, M.A.; MEYER, P. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. **Trends Plant Sci**, v.4, p.340-347, 1999.
- KORIMBOCUS, J.; COATES, D.; BARKER, I.; BOONHAM, N. Improved detection of *Sugarcane yellow leaf virus* using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. **J Virol Methods**, v.103, p.109-120, 2002.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Brief Bioinform**, v.5, p.150-163, 2004.
- LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.L.P.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Sugarcane Biotechnology: the Challenges and Opportunities. **In Vitro Cell Dev Biol-Plant**, v.41, p.345-363, 2005.
- LEIBBRANDT, N.B.; SNYMAN, S.J. Stability of gene expression and agronomic performance of a transgenic herbicide-resistant sugarcane line in South Africa. **Crop Sci**, v.43, p.671-677, 2003.
- LIM, S.; KIM, Y.-H.; KIM, S.-H.; KWON, S.-Y.; LEE, H.-S.; KIM, J.-S.; CHO, K.-Y.; PAEK, K.-Y.; KWAK, S.-S. Enhanced tolerance of transgenic sweetpotato plants that express both CuZnSOD and APX in chloroplasts to methyl viologen-mediated oxidative stress and chilling. **Mol Breeding**, v.19, p.227-239, 2007.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- LIU, Y.-G.; WHITTIER, R.F. Thermal Asymmetric Interlaced PCR: Automatable Amplification and Sequencing of Insert End Fragments from P1 and YAC Clones for Chromosome Walking. **Genomics**, v.25, p.674-681, 1995.

- LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; PESSOA, L.G.A. Seleção de Isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a Cigarrinha da Raiz da Cana-de-Açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em Laboratório. **Neotrop Entomol**, v.34, p.791-798, 2005.
- LUO, H.; LEE, J.-Y.; HU, Q.; NELSON-VASILCHIK, K.; EITAS, T.K.; LICKWAR, C.; KAUSCH, A.P.; CHANDLEE, J.M.; HODGES, T.K.. RTS, a rice anther-specific gene is required for male fertility and its promoter sequence directs tissue-specific gene expression in different plant species. **Plant Mol Biol**, v.62, p.397-408, 2006.
- LUU, D.-T.; MAUREL, C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. **Plant Cell Environ**, v.28, p.85-96, 2005.
- MACEDO, I.C.; LEAL, M.R.L.V.; DA SILVA, J.E.A.R. **Assessment of greenhouse gas emissions in the production and use of fuel ethanol in Brazil**. Governo do Estado de São Paulo, 2004. Disponível em: http://www.unica.com.br/i_pages/files/gee3.pdf. Acesso em: 25 maio 2007.
- MCELROY, D.; ZHANG, W.; CAO, J.; WU, R. Isolation of an Efficient Actin Promoter for Use in Rice Transformation. **Plant Cell**, v.2, p.163-171, 1990.
- MACKINTOSH, C.A.; LEWIS, J.; RADMER, L.E.; SHIN, S.; HEINEN, S.J.; SMITH, L.A.; WYCKOFF, M.N.; DILL-MACKY, R.; EVANS, C.K.; KRAVCHENKO, S.; BALDRIDGE, G.D.; ZEYEN, R.J.; MUEHLBAUER, G.J. Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to Fusarium head blight. **Plant Cell Rep**, v.26, p.479-488, 2007.
- MEIYALAGHAN, S.; JACOBS, J.M.E.; BUTLER, R.C.; WRATTEN, S.D.; CONNER, A.J. Transgenic Potato Lines Expressing *cry1Ba1* or *cry1Ca5* Genes are Resistant to Potato Tuber Moth. **Potato Research**, v.49, p.203-216, 2006.
- MILLIGAN, S.B.; BALZARINI, M.; WHITE, W.H. Broad-Sense Heritabilities, Genetic Correlations, and Selection Indices for Sugarcane Borer Resistance and Their Relation to Yield Loss. **Crop Sci**, v.43, p.1729-1735, 2003.
- MING, R.; LIU, S.-C.; LIN, Y.-R.; DA SILVA, J.; WILSON, W.; BRAGA, D.; VAN DEYNZE, A.; WENSLAFF, T.F.; WU, K.K.; MOORE, P.H.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M.E.; IRVINE, J.E.; PATERSON, A.H. Detailed Alignment of Saccharum and Sorghum Chromosomes: Comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. **Genetics**, v.150, p.1663-1682, 1998.
- MING, R.; LIU, S.-C.; BOWERS, J.E.; MOORE, P.H.; IRVINE, J.E.; PATERSON, A.H. Construction of a *Saccharum* Consensus Genetic Map from Two Interspecific Crosses. **Crop Sci**, v.42, p.570-583, 2002.
- MIZUTANI, M.; WATANABE, S.; NAKAGAWA, T.; MAESHIMA, M. Aquaporin NIP2;1 is mainly localized to the ER membrane and shows root-specific accumulation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol**, v.47, p.1420-1426, 2006.
- MOHAN, R. **Desenvolvimento de Bioprocessos: Bagaço de Cana-de-Açúcar como Suporte Alternativo na Fase de Enraizamento e Aclimação de Plântulas de Macieira, Morangueiro e Cafeeiro**. 2005. 129f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- MOORE, P.H. Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: towards developing an understanding of the gene-to-crop continuum. **Field Crop Res**, v.92, p.119-135, 2005.

- NEUTEBOOM, L.W.; KUNIMITSU, W.Y.; WEBB, D.; CHRISTOPHER, D.A. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. **Plant Sci**, v.163, p.1021-1035, 2002.
- OBREGON, P.; CHARGELEGUE, D.; DRAKE, P.M.W.; PRADA, A.; NUTTALL, J.; FRIGERIO, L.; MA, J.K-C. HIV-1 p24-immunoglobulin fusion molecule: a new strategy for plant-based protein production. **Plant Biotechnol J**, v.4, p.195-207, 2006.
- OH, S.-J.; SONG, S.I.; KIM, Y.S.; JANG, H.-J.; KIM, S.Y.; KIM, M.; KIM, Y.-K.; NAHM, B.H.; KIM, J.-K. Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in Transgenic Rice Increased Tolerance to Abiotic Stress without Stunting Growth. **Plant Physiol**, v.138, p.341-351, 2005.
- OHLER, U.; NIEMANN, H. Identification and analysis of eukaryotic promoters: recent computational approaches. **Trends Genet**, v.17, p.56-60, 2001.
- OLIVEIRA, F.S.; ROCHA, M.R.; REIS, A.J.S.; MACHADO, V.O.F.; SOARES, R.A.B. Efeito de Produtos Químicos e Naturais sobre a População de Nematóide *Pratylenchus brachyurus* na Cultura da Cana-de-Açúcar. **Pesq Agropec Trop**, v.35, p.171-178, 2005.
- OPSAHL-SORTEBERG, H.-G.; DIVON, H.H.; NIELSEN, P.S.; KALLA, R.; HAMMOND-KOSACK, M.; SHIMAMOTO, K.; KOHLI, A. Identification of a 49-bp fragment of the *HvLTP2* promoter directing aleurone cell specific expression. **Gene**, v.341, p.49-58, 2004.
- ORPLANA – Organização dos Plantadores de Cana da Região Centro-Sul do Brasil. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.orplana.com.br/estatisticas.asp>>. Acesso em: 12 jun 2007.
- PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA, F.R.; VÊNCIO, R.Z.N.; OLIVEIRA, K.C.; FELIX, J.M.; VICENTINI, R.; ROCHA, C.S.; SIMÕES, A.C.Q.; ULIAN, E.C.; DI MAURO, S.M.Z.; SILVA, A.M.; PEREIRA, C.A.B.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Transcription Profiling of Signal Transduction-Related Genes in Sugarcane Tissues. **DNA Res**, v.12, p.27-38, 2005.
- PETRASOVITS, L.A.; PURNELL, M.P.; NIELSEN, L.K.; BRUMBLEY, S.M. Production of polyhydroxybutyrate in sugarcane. **Plant Biotechnol J**, v.5, p.162-172, 2007.
- PINTO, A.S.; PARRA, J.R.P.; OLIVEIRA, H.N.; ARRIGONI, E.D.B. Comparação de Técnicas de Liberação de *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Para o Controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). **Neotrop Entomol**, v.32, p.311-318, 2003.
- POMPERMAYER, P. **Identificação e Caracterização de um Promotor de Cana-de-açúcar Induzido por Herbivoria**. 2004. 142f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- PRAKASH, C.S. The Genetically Modified Crop Debate in the Context of Agricultural Evolution. **Plant Physiol**, v.126, p.8-15, 2001.
- QIN, F.; SAKUMA, Y.; LI, J.; LIU, Q.; LI, Y.-Q.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Cloning and Functional Analysis of a Novel DREB1/CBF Transcription Factor Involved in Cold-Responsive Gene Expression in *Zea mays* L. **Plant Cell Physiol**, v.45, p.1042-1052, 2004.
- QU, L.Q.; TAKAIWA, F. Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice. **Plant Biotechnol J**, v.2, p.113-125, 2004.
- RABBANI, M.A.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KHAN, M.A.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring

- Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Abscisic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Analyses. **Plant Physiol**, v.133, p.1755-1767, 2003.
- RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.L.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time PCR data. **Neurosci Lett**, v.339, p.62-66, 2003.
- RANCE, I.; NORRE, F.; GRUBER, V.; THEISEN, M. Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein over-expression in plants. **Plant Sci**, v.162, p.833-842, 2002.
- RÍPOLI, T.C.C.; MOLINA JR, W.F.; RÍPOLI, M.L.C. Energy Potential of Sugar Cane Biomass in Brazil. **Sci Agr**, v.57, p.677-681, 2000.
- ROSA, R.C.T.; MOURA, R.M.; PEDROSA, E.M.R. Efeitos do uso de *Crotalaria juncea* e carbofuran em fitonematóides ectoparasitos de cana-de-açúcar. **Fitopatol Bras**, v.29, p.447-449, 2004.
- ROSAS-GARCÍA, N.M. Laboratory and field tests of spray-dried and granular formulations of a *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against the sugarcane borer. **Pest Manag Sci**, v.62, p.855-861, 2006.
- ROSAS-GARCÍA, N.M.; PEREYRA-ALFÉREZ, B.; NIÑO, K.A.; GALÁN-WONG, L.J.; MORALES-RAMOS, L.H. Novel toxicity of native and HD *Bacillus thuringiensis* strains to the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. **BioControl**, v.49, p.455-465, 2004.
- ROSS, E.J.H.; STONE, J.M.; ELOWSKY, C.G.; ARREDONDO-PETER, R.; KLUCAS, R.V.; SARATH, G. Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. **J Exp Bot**, v.55, p.1721-1731, 2004.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Eds). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p.365-386. Disponível em: <<http://primer3.sourceforge.net>>. Acesso em 29 maio 2007.
- SAKAI, H.; AOYAMA, T.; OKA, A. Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. **Plant J**, v.24, p.703-711, 2000.
- SAKURAI, J.; ISHIKAWA, F.; YAMAGUCHI, T.; UEMURA, M.; MAESHIMA, M. Identification of 33 Rice Aquaporin Genes and Analysis of Their Expression and Function. **Plant Cell Physiol**, v.46, p.1568-1577, 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 608p.
- SANTOS, A.S. 2003. Doenças Causadas por Fungos e Bactérias em Cana-de-Açúcar. **Anais do IX Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**. Catanduva, 2003. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/IXRifib>>. Acesso em: 29 maio 2007.
- SASAKI, K.; HIRAGA, S.; ITO, H.; SEO, S.; MATSUI, H.; OHASHI, Y. A wound-inducible tobacco peroxidase gene expresses preferentially in the vascular system. **Plant Cell Physiol**, v.43, p.108-117, 2002.
- SCHÜNEMANN, P.H.D.; RICHARDSON, A.E.; SMITH, F.W.; DELHAIZE, E. Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). **J Exp Bot**, v.55, p.855-865, 2004.
-

- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **J Exp Bot**, v.58, p.221-227, 2007.
- SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ABE, H.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. **Plant Cell**, v.13, p.61-72, 2001.
- SHEN, Y.-G.; DU, B.-X.; ZHANG, W.K.; ZHANG, J.-S.; CHEN, S.-Y. *AhCMO*, regulated by stresses in *Atriplex hortensis*, can improve drought tolerance in transgenic tobacco. **Theor Appl Genet**, v.105, p.815-821, 2002.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Curr Opin Plant Biol**, v.6, p.410-417, 2003.
- SHOU, H.; BORDALLO, P.; WANG, K. Expression of the *Nicotiana* protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. **J Exp Bot**, v.55, p.1013-1019, 2004.
- SILFVERBERG-DILWORTH, E.; BESSE, S.; PARIS, R.; BELFANTI, E.; TARTARINI, S.; SANSAVINI, S.; PATOCCHI, A.; GESSLER, C. Identification of functional apple scab resistance gene promoters. **Theor Appl Genet**, v.110, p.1119-1126, 2005.
- SIVAMANI, E.; QU, R. Expression enhancement of a rice polyubiquitin gene promoter. **Plant Mol Biol**, v.60, p.225-239, 2006.
- SONG, F.; GOODMAN, R.M. Cloning and identification of the promoter of the tobacco *Sar8.2b* gene, a gene involved in systemic acquired resistance. **Gene**, v.290, p.115-124, 2002.
- SUZUKI, M.; KETTERLING, M.G.; MCCARTY, D.R. Quantitative Statistical Analysis of *cis*-Regulatory Sequences in ABA/VP1- and CBF/DREB1-Regulated Genes of Arabidopsis. **Plant Physiol** **preview**, 2005. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.104.058412>>. Acesso em: 5 julho 2007.
- TANG, W.; NEWTON, R.J.; LI, C.; CHARLES, T.M. Enhanced stress tolerance in transgenic pine expressing the pepper *CaPFI* gene is associated with the polyamine biosynthesis. **Plant Cell Rep**, v.26, p.115-124, 2007.
- TATUSOVA, T.A.; MADDEN, T.L. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. **FEMS Microbiol Lett**, v.174, p.247-250, 1999.
- TAVVA, V.S.; KIM, Y.-H.; KAGAN, I.A.; DINKINS, R.D.; KIM, K.-H.; COLLINS, G.B. Increased α -tocopherol content in soybean seed overexpressing the *Perilla frutescens* γ -tocopherol methyltransferase gene. **Plant Cell Rep**, v.26 p.61-70, 2007.
- TERAUCHI, R.; KAHL, G. Rapid Isolation of Promoter Sequences by TAIL-PCR: the 5'-Flanking Regions of *Pal* and *Pgi* Genes from yams (*Dioscorea*). **Mol Genet Genomics**, v.263, p.554-560, 2000.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res**, v.24, p.4876-4882, 1997.
-

- TITTARELLI, A.; MILLA, L.; VARGAS, F.; MORALES, A.; NEUPERT, C.; MEISEL, L.A.; SALVO-G, H.; PEÑALOZA, E.; MUÑOZ, G.; CORCUERA, L.J.; SILVA, H. Isolation and comparative analysis of the wheat *TaPT2* promoter: identification *in silico* of new putative regulatory motifs conserved between monocots and dicots. **J Exp Bot**, 2007. Disponível em: <<http://jxb.oxfordjournals.org/papbyrecent.dtl>>. Acesso em: 12 julho 2007.
- TRAN, L.-S.P.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; SIMPSON, S.D.; FUJITA, Y.; MARUYAMA, K.; FUJITA, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Isolation and Functional Analysis of Arabidopsis Stress-Inducible NAC Transcription Factors That Bind to a Drought-Responsive *cis*-Element in the *early responsive to dehydration stress 1* Promoter. **Plant Cell**, v.16, p.2481-2498, 2004.
- UCHIUMI, T.; SHIMODA, Y.; TSURUTA, T.; MUKOYOSHI, Y.; SUZUKI, A.; SENOO, K.; SATO, S.; KATO, T.; TABATA, S.; HIGASHI, S.; ABE, M. Expression of Symbiotic and Nonsymbiotic Globin Genes Responding to Microsymbionts on *Lotus japonicus*. **Plant Cell Physiol**, v.43, p.1351-1358, 2002.
- UEDA, A.; KATHIRESAN, A.; INADA, M.; NARITA, Y.; NAKAMURA, T.; SHI, W.; TAKABE, T.; BENNETT, J. Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does. **J Exp Bot**, v.55, p.2213-2218, 2004.
- UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Curr Opin Biotech**, v.17, p.1-10, 2006.
- ÚNICA – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br>>. Acesso em: 26 maio 2007.
- VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H.T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Curr Opin Plant Biol**, v.9, p.1-7, 2006.
- VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genet Mol Biol**, v.24, p.1-7, 2001.
- VICENTINI, R.; SASSAKI, F.T.; GIMENES, M.A.; MAIA, I.G.; MENOSSI, M. *In silico* evaluation of the *Eucalyptus* transcriptome. **Genet Mol Biol**, v.28, p.487-495, 2005.
- VICKERS, J.E.; GROF, C.P.L.; BONNETT, G.D.; JACKSON, P.A.; KNIGHT, D.P.; ROBERTS, S.E.; ROBINSON, S.P. Overexpression of *Polyphenol Oxidase* in Transgenic Sugarcane Results in Darker Juice and Raw Sugar. **Crop Sci**, v.45, p.354-362, 2005.
- VIEWEG, M.F.; FRUHLING, M.; QUANDT, H.J.; HEIM, U.; BAUMLEIN, H.; PUHLER, A.; KUSTER, H.; ANDREAS, M.P. The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene *VfLb29* is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. **Mol Plant Microbe Interact**, v.17, p.62-69, 2004.
- XIAO, K.; ZHANG, C.; HARRISON, M.; WANG, Z.-Y. Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. **Mol Breeding**, v.15, p.221-231, 2005.
- XU, J.; SHPAK, E.; GU, T.; MOO-YOUNG, M.; KIELISZEWSKI, M. Production of Recombinant Plant Gum With Tobacco Cell Culture in Bioreactor and Gum Characterization. **Biotechnol Bioeng**, v.90, p.578-588, 2005.

- XU, Y.; BUCHHOLZ, W.G.; DEROSE, R.T.; HALL, T.C. Characterization of a rice gene family encoding root-specific proteins. **Plant Mol Biol**, v.27, p.237-248, 1995.
- YAMADA, S.; NELSON, D.E.; LEY, E.; MARQUEZ, S.; BOHNERT, H.J. The Expression of an Aquaporin Promoter from *Mesembryanthemum crystallinum* in Tobacco. **Plant Cell Physiol**, v.38, p.1326-1332, 1997.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; KASUGA, M.; LIU, Q.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; SHINWARI, Z.K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K. Biological mechanisms of drought stress response. **JIRCAS Working Report**, p.1-8, 2002.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. **Annu Rev Plant Biol**, v.57, p.781-803, 2006.
- YAMAMOTO, Y.T.; TAYLOR, C.G.; ACEDO, G.N.; CHENG, C.-L.; CONKLING, M.A. Characterization of *cis*-Acting Sequences Regulating Root-Specific Gene Expression in Tobacco. **Plant Cell**, v.3, p.371-382, 1991.
- WADA, A.C. Control of sugarcane smut disease in Nigeria with fungicides. **Crop Prot**, v.22, p.45-49, 2003.
- WANG, S.-J.; LAN, Y.-C.; CHEN, S.F.; CHEN, Y.M.; YEH, K.-W. Wound-response regulation of the sweet potato sporamin gene promoter region. **Plant Mol Biol**, v.48, p.223-231, 2002.
- WANG, M.-L.; GOLDSTEIN, C.; SU, W.; MOORE, P.H.; ALBERT, H.H. Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory. **Transgenic Res**, v.14, p.167-178, 2005.
- WEI, H.; WANG, M.-L.; MOORE, P.H.; ALBERT, H.H. Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. **J Plant Physiol**, v.160, p.1241-1251, 2003.
- WHITE, W.H.; MILLER, J.D.; MILLIGAN, S.B.; BURNER, D.M.; LEGENDRE, B.L. Inheritance of Sugarcane Borer Resistance in Sugarcane Derived from Two Measures of Insect Damage. **Crop Sci**, v.41, p.1706-1710, 2001.
- WU, L.; BIRCH, R.G. Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. **Plant Biotechnol J**, v.5, p.109-117, 2007.
- ZHANG, S.Z.; YANG, B.P.; FENG, C.L.; CHEN, R.K.; LUO, J.P.; CAI, W.W.; LIU, F.H. Expression of the *Grifola frondosa trehalose synthase* gene and improvement of drought-tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **J Integr Plant Biol**, v.48, p.453-459, 2006.
- ZHANG, Y.; FRANKENBERGER Jr, W.T. Removal of Selenate in Simulated Agricultural Drainage Water by a Rice Straw Bioreactor Channel System. **J Environ Qual**, v.32, p.1650-1657, 2003.
- ZHENG, Z.; MURAI, N. A distal promoter regions of the rice seed storage protein glutelin gene enhanced quantitative gene expression. **Plant Sci**, v.128, p.59-65, 1997.
- ZHU, Q.; ORDIZ, M.I.; DABI, T.; BEACHY, R.N.; LAMB, C. Rice TATA binding protein interacts functionally with transcription factor IIB and the RF2a bZIP transcriptional activator in an enhanced plant in vitro transcription system. **Plant Cell**, v.14, p.795-803, 2002.
-

ZIMMERMANN, P.; HIRSCH-HOFFMANN, M.; HENNIG, L.; GRUISSEM, W. Geneinvestigator: Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. **Plant Physiol**, v.136, p.2621-2632, 2004.



Anexo

Anexo – Sequências similares a SCCCRT1004A07 utilizadas na análise filogenética.

Nomenclatura	Espécie	Número de acesso	Banco de dados
<i>Classe Eudicotyledons</i>			
Atha1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT1G12090	TAIR
Atha2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT4G12510	TAIR
Atha3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT4G12520	TAIR
Atha4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT2G45180	TAIR
Atha5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT1G62510	TAIR
Atha6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT5G46900	TAIR
Atha7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT5G46890	TAIR
Atha13	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT4G12530	TAIR
Gmax3	<i>Glycine max</i>	Q9LKY8	Pfam
Mtru1	<i>Medicago truncatula</i>	AC122726_30.1	TIGR
Ntab9	<i>Nicotiana tabacum</i>	Q9FXS2	Pfam
Ptri1	<i>Populus trichocarpa</i>	PU00546	JGI
Ptri2	<i>Populus trichocarpa</i>	PU01456	JGI
Pnig	<i>Populus nigra</i>	Q42487	Pfam
<i>Classe Liliopsida</i>			
Osat1	<i>Oryza sativa</i>	Os02g44310	TIGR
Osat2	<i>Oryza sativa</i>	Os04g46820	TIGR
Osat3	<i>Oryza sativa</i>	Os04g46810	TIGR
Osat4	<i>Oryza sativa</i>	Os10g40614	TIGR
Osat5	<i>Oryza sativa</i>	Os10g40510	TIGR
Osat6	<i>Oryza sativa</i>	Os10g40520	TIGR
Osat7	<i>Oryza sativa</i>	Os03g01300	TIGR
Osat9	<i>Oryza sativa</i>	Os03g01310	TIGR
Osat10	<i>Oryza sativa</i>	Os10g40530	TIGR
Osat11	<i>Oryza sativa</i>	Os02g44320	TIGR
Osat14	<i>Oryza sativa</i>	Os10g40460	TIGR
Osat15	<i>Oryza sativa</i>	Os10g40440	TIGR
Osat16	<i>Oryza sativa</i>	Os10g40470	TIGR
Osat17	<i>Oryza sativa</i>	Os10g20890	TIGR
Osat19	<i>Oryza sativa</i>	Os10g40480	TIGR
Taes3	<i>Triticum aestivum</i>	TA80391_4565	TIGR
Taes5	<i>Triticum aestivum</i>	TA80390_4565	TIGR
Taes6	<i>Triticum aestivum</i>	TA82815_4565	TIGR
Taes7	<i>Triticum aestivum</i>	TA90565_4565	TIGR
Taes8	<i>Triticum aestivum</i>	TA67400_4565	TIGR

Continuação

Nomenclatura	Espécie	Número de acesso	Banco de dados
Taes9	<i>Triticum aestivum</i>	TA67401_4565	TIGR
Taes10	<i>Triticum aestivum</i>	TA67404_4565	TIGR
Taes11	<i>Triticum aestivum</i>	TA67405_4565	TIGR
Taes12	<i>Triticum aestivum</i>	TA52368_4565	TIGR
Taes13	<i>Triticum aestivum</i>	TA51101_4565	TIGR
Taes15	<i>Triticum aestivum</i>	TA51796_4565	TIGR
Taes17	<i>Triticum aestivum</i>	TA63593_4565	TIGR
Taes20	<i>Triticum aestivum</i>	TA50361_4565	TIGR
Taes21	<i>Triticum aestivum</i>	TA67403_4565	TIGR
Taes22	<i>Triticum aestivum</i>	TA52393_4565	TIGR
Taes23	<i>Triticum aestivum</i>	TA51790_4565	TIGR
Taes25	<i>Triticum aestivum</i>	TA96744_4565	TIGR
Taes26	<i>Triticum aestivum</i>	TA51784_4565	TIGR
Taes28	<i>Triticum aestivum</i>	TA51789_4565	TIGR
Taes29	<i>Triticum aestivum</i>	TA51780_4565	TIGR
Taes35	<i>Triticum aestivum</i>	TA51094_4565	TIGR
Taes38	<i>Triticum aestivum</i>	TA97380_4565	TIGR
Taes39	<i>Triticum aestivum</i>	TA62031_4565	TIGR
Zmay1	<i>Zea mays</i>	AZM4_25746	TIGR
Zmay2	<i>Zea mays</i>	AZM4_80178	TIGR
Zmay3	<i>Zea mays</i>	AZM4_38092	TIGR
Zmay4	<i>Zea mays</i>	AZM4_33587	TIGR
Zmay5	<i>Zea mays</i>	AZM4_32589	TIGR
Zmay7	<i>Zea mays</i>	AZM4_61660	TIGR
Zmay10	<i>Zea mays</i>	AZM4_3877	TIGR
Zmay11	<i>Zea mays</i>	AZM4_134002	TIGR
Zmay12	<i>Zea mays</i>	AZM4_50681	TIGR
Zmay13	<i>Zea mays</i>	AZM4_16699	TIGR
Zmay14	<i>Zea mays</i>	AZM4_50680	TIGR
Zmay15	<i>Zea mays</i>	AZM4_50679	TIGR
SSoff2	<i>Saccharum spp</i>	SCEQRT1028B06.g	SUCEST
SSoff3	<i>Saccharum spp</i>	SCMCRT2103H09.g	SUCEST
SSoff4	<i>Saccharum spp</i>	SCJFRT2054H10.g	SUCEST
SSoff5	<i>Saccharum spp</i>	SCCCRT2C02B08.g	SUCEST
SSoff6	<i>Saccharum spp</i>	SCSFRT2072C07.g	SUCEST
SSoff7	<i>Saccharum spp</i>	SCRURT3062F10.g	SUCEST
SSoff8	<i>Saccharum spp</i>	SCMCRT2107E04.g	SUCEST

Continuação

Nomenclatura	Espécie	Número de acesso	Banco de dados
SSoff9	<i>Saccharum spp</i>	SCEQRT2094D07.g	SUCEST
SSoff11	<i>Saccharum spp</i>	SCCCRT2C09C02.g	SUCEST
SSoff15	<i>Saccharum spp</i>	SCQGLR2032E05.g	SUCEST
SSoff17	<i>Saccharum spp</i>	SCCCST3006E07.g	SUCEST
SSoff18	<i>Saccharum spp</i>	SCJFRT1008A10.g	SUCEST
SSoff19	<i>Saccharum spp</i>	SCMCRT2103A12.g	SUCEST
SSoff20	<i>Saccharum spp</i>	SCSFRT2072B07.g	SUCEST
SSoff21	<i>Saccharum spp</i>	SCJLRT3078H11.g	SUCEST
TSoff3	<i>Saccharum officinarum</i>	TC59807	TIGR
TSoff7	<i>Saccharum officinarum</i>	TC50644	TIGR
TSoff9	<i>Saccharum officinarum</i>	TC68764	TIGR
TSoff11	<i>Saccharum officinarum</i>	CA114210	TIGR
TSoff16	<i>Saccharum officinarum</i>	TC50774	TIGR
TSoff25	<i>Saccharum officinarum</i>	TC49043	TIGR