OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE EM CANA-DE-AÇÚCAR: CARACTERIZAÇÃO DE GENES SOB ESTRESSE HÍDRICO E ABORDAGENS TRANSGÊNICAS

RAFAEL MANIERO

BOTUCATU – SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE EM CANA-DE-AÇÚCAR: CARACTERIZAÇÃO DE GENES SOB ESTRESSE HÍDRICO E ABORDAGENS TRANSGÊNICAS

Aluno

RAFAEL MANIERO

Orientador

Dr. DOUGLAS SILVA DOMINGUES

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU – SP

2015

1. Sumário

RESUMO 1

ABSTRACT 2

1 INTRODUÇÃO 3

1.1 A Cana-de-açúcar: aspectos econômicos 3

1.2 Aspectos botânicos e composição do genoma das cultivares modernas 3

1.3 Biotecnologia em cana-de-açúcar 4

1.4 A cultivar SP80-3280 5

1.5 Estresses abióticos 6

1.5.1 Estresse hídrico 6

1.6 Família dos Oligossacarídeos de Rafinose 8

1.6.1 Galactinol Sintase 10

1.6.2 Rafinose Sintase 12

1.6.3 Estaquiose Sintase 13

1.7 OBJETIVO 14

2 CAPÍTULO 1 - Genes relacionados a síntese de RFOs em cana-de-açúcar são modulados pelo estresse hídrico 15

2.1 Materiais e Métodos 15

2.1.1 Identificação *in silico* de genes envolvidos na produção de RFOs em cana-de-açúcar 15

2.1.2 Galactinol Sintase, Rafinose Sintase e Estaquiose Sintase 15

2.1.3 Análise Filogenética 16

2.1.4 Experimento de deficiência hídrica 16

2.1.5 Parâmetros Fisiológicos 17

2.1.6 Análise transcricional: plataforma Illumina 18

2.1.7 Análise transcricional por qPCR 18

2.1.8 Análise estatística 19

2.2 Resultados 20

2.2.1 Identificação e montagem do gene *ScGolS1* 20

2.2.1.1 Análise Filogenética de Galactinol Sintase 21
2.2.1.2 Análise Filogenética de Rafinose Sintase em cana-de-açúcar 22
2.2.1.3 Análise Filogenética de Estaquiose Sintase em cana-de-açúcar 23
2.2.2 Avaliação fisiológica sob estresse hídrico 24
2.2.3 Avaliação transcricional *in silico* do genes RFOs em cana 26
2.2.4 Avaliação transcricional dos genes relacionados a síntese RFOs sob estresse hídrico 27
2.2.4.1 Galactinol Sintase 27
2.2.4.2 Rafinose Sintase 29
2.2.4.3 Estaquiose Sintase 30
2.3 Discussão 31
3 CAPÍTULO 2 - A galactinol sintase de cafeeiro (*CaGolS2*) pode promover alterações morfológicas e fisiológicas em cana-de-açúcar 34
3.1 Materiais e Métodos 34
3.1.1 Material vegetal e cultura de tecidos 34
3.1.2 Construção do vetor para transformação genética 35
3.1.3 Transformação genética de cana-de-açúcar por biobalistica 36
3.1.4 Seleção e confirmação molecular dos eventos transformados 37
3.1.5 Transferência de plantas em ambiente de contenção 37
3.1.6 Extração de RNA, síntese de cDNA e avaliação transcricional de *CaGolS2* nas plantas transgênicas de cana-de-açúcar. 38
3.1.7 Caracterização mofológica e fisiológica das plantas transgênicas 39
3.2 Resultados e Discussão 39
3.2.1 Inserção da região codificante do gene *CaGolS2* no vetor de transformação 39
3.2.2 Regeneração, confirmação e multiplicação dos eventos transgênicos 40
3.2.3 Avaliação transcricional do gene *CaGolS2* em cana-de-açúcar transgênica 41
3.2.4 Caracterização morfológica e fisiológica das plantas transgênicas 43
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS 46
5 REFERÊNCIAS 47
6 ANEXOS 57

RESUMO

A aplicação energética dos subprodutos da cana-de-açúcar faz dessa cultura uma das líderes em investimentos do agronegócio internacional. Para suprir a demanda mundial e expandir o setor sucroenergético, estratégias de engenharia genética que possam gerar plantas transgênicas mais tolerantes a estreses bióticos e abióticos podem ser uma alternativa para ganhos de produtividade. Um dos mecanismos mais utilizados em plantas para minimizar os efeitos causados por estresses é o acúmulo de solutos. Entre eles, pode ser destacada a família de oligossacarídeos da rafinose (RFOs). Ela é formada a partir da adição sucessiva de radicais galactosil a uma molécula de sacarose, em reação catalisada pelas enzimas galactinol sintase (GolS), rafinose sintase e estaquiose sintase. A *GolS* é considerada o passo-chave de regulação da síntese de RFOs em plantas modelo. Embora a compreensão das etapas moleculares da produção de RFOs e sua modulação por estresses abióticos tenham potencial de contribuir na tolerância a estresses em plantas, esta estratégia é pouco compreendida em gramíneas, entre elas a cana-de-açúcar. Neste sentido, o presente trabalho pretende compreender aspectos moleculares relativos à produção de RFOs em cana-de-açúcar e sua relação com estresses abióticos e desenvolvimento. Para tanto, foram avaliados transcricionalmente genes relacionados a síntese de RFOs em cana sob estresse hídrico, bem como obteve-se plantas transgênicas com expressão constitutiva do gene *CaGolS2*, uma galactinol sintase de cafeeiro. Sob estresse hídrico, gene *ScGolS1* teve seu nível transcricional reduzido em folhas e induzido em colmo. *ScRFS1* nos dois tecidos tem o padrão transcricional diretamente relacionado ao aumento da severidade do estresse, e o mesmo é observado em *ScSTS1*. Foram também obtidos 10 eventos transgênicos de cana-de-açúcar com a região codificante do gene *CaGolS2* de *Coffea arabica*, dos quais 6 expressam o transgene. Esses eventos apresentaram diferenças morfológicas e de assimilação de carbono quando comparados a plantas não-transformadas. Diante disso, inferimos que o padrão estresse-responsivo dos genes de síntese de RFOs auxilia na translocação de carbono em cana sob estresse hídrico e que a rafinose e estaquiose podem ter maior importância que o galactinol neste processo. Além disso, os eventos transgênicos apresentam características de interesse na seleção de plantas jovens, sugerindo que eventos transgênicos para *GolS* sejam tenham potencial aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: oligossacarídeos, estresses abióticos, cana-de-açúcar

ABSTRACT

Bioenergy application of sugarcane byproducts are making this crop one of the most important in the international agribusiness investments. To meet global demand and expand the sugarcane sector, genetic engineering strategies generating transgenic plants more tolerance to biotic and abiotic stresses is a promising to improve productivity. One of the most relevant mechanism related to stress tolerance in plants involves the accumulation of distinct solutes. The Raffinose Oligosaccharids Family synthesis starts from the successive addition of galactosyl radicals to a sucrose molecule, in a reaction catalyzed by galactinol synthase (GolS), raffinose synthase and stachyose synthase. *GolS* plays a key role in RFOs production in model plants. Although the stress-responsive action of RFOs may improve abiotic stress tolerance in plants, these mechanisms are almost completely unknown in grasses, like sugarcane. In this context, this study aims to understand molecular aspects of RFOs synthesis and its relation with abiotic stresses. We have evaluated the transcriptional level of genes related RFOs synthesis under water stress and we produced transgenic plants constitutively expressing a coffee galactinol synthase (*CaGolS2*). Under water stress, *ScGolS1* was downregulated in leaves, but upregulated in stems. *ScRFS1* and *ScSTS1* were upregulated in both tissues, in a direct correlation between transcription level and stress. We produced 10 transgenic events containing the coding region of *CaGolS2*; in six events, the transgene were transcriptionally active. Transgenic plants presented differences in morphology and carbon assimilation when compared to non-transgenic controls. Overall, we inferred that the stress-responsive pattern of RFO synthesis genes might help carbon relocation during water stress. Raffinose and stachyose seems to have greater impact than galactinol in this process. Furthermore, *CaGolS2* transgenic plants have promising traits for breeding, suggesting that these events should be evaluate under adverse conditions.

Keywords: oligosaccharides, abiotic stresses, sugarcane

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Cana-de-açúcar: aspectos econômicos

A cana-de-açúcar é uma das mais importantes culturas do setor primário da agroindústria brasileira. Atualmente, o Brasil é o principal produtor mundial e ocupa uma posição de destaque na produção de açúcar e etanol derivados de cana (ARRUDA, 2011). O total em área plantada de cana no Brasil fica atrás apenas da soja e do milho (CONAB, 2015). O Brasil deverá produzir 654,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2015/2016, em pouco mais de 9 milhões de hectares.

O cultivo da cana no Brasil ocorre nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Em termos econômicos, a produção brasileira é dividida em Nordeste (que engloba além do Nordeste, parte das regiões Norte e Centro-Oeste) e Centro-Sul (demais regiões produtoras) (CONAB, 2015).

1.2 Aspectos botânicos e composição do genoma das cultivares modernas

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae, a qual compreende mais de 700 gêneros e mais de 10 mil espécies, incluindo algumas de grande importância para a agricultura, como o arroz (*Oryza sativa*), o milho (*Zea mays*), a cevada (*Hordeum vulgare*) e o trigo (*Triticum aestivum*). De taxonomia complexa devido aos cruzamentos interespecíficos, o gênero *Saccharum* inclui várias espécies de difícil distinção morfológica e genética (DE SETTA et al., 2012).

A cana é uma gramínea semiperene de metabolismo C4, composta por colmos que atingem 2-5 metros de comprimento (TAIZ e ZEIGER, 2004; CHEAVENGATTI-GIANOTTO et al., 2011). O desenvolvimento da cana em cultivos agrícolas ocorre em dois ciclos: cana-planta, mediado por plantio direto na qual a planta ainda não sofreu o primeiro corte; cana-soca, que após o primeiro corte, a planta se desenvolve sem a necessidade do replantio por até três safras (CONAB, 2015).

As cultivares modernas de cana são oriundas de cruzamentos entre as espécies do gênero *Saccharum,* que datam do final do século XIX (MATSUOKA et al. 2005). *Saccharum officinarum* é a espécie mais importante na contribuição genética entre as variedades existentes no mercado, seguida de *Saccharum spontaneum*. Outras espécies, como *Saccharum sinense*, *Saccharum barberi* e *Saccharum robustum*,

também contribuíram de forma minoritária para a formação das cultivares atuais (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011)

A espécie *S. officinarum* apresenta indivíduos com grande acúmulo de sacarose e vigor dos colmos, espessos e pouco fibrosos (SCARPARI e BEAUCLAIR, 2008). Exige ainda condições de alta fertilidade do solo e suprimento de água, e geralmente é susceptível a doenças (MARTIN, 1991; RICAUD, 2012). *S. spontaneum,* conhecida como cana-de-açúcar selvagem, possui grande variação intraespecífica: a morfologia varia desde plantas pequenas e sem colmo diferenciado, similares a grama comum, até plantas de 5m de altura com colmos longos, estreitos e fibrosos (MATSUOKA, 1999). Nos híbridos, o genoma *S. spontaneum* é considerado o responsável por genes que contribuíram para o vigor, durabilidade, perfilhamento e resistência a diversas doenças (CHANDEL et al., 2009).

A elevada ploidia é outra característica do gênero *Saccharum*. *S. officinarum* é octaploide (2n = 80) com x = 10 cromossomos (D'HONT et al, 1996); já o genoma de *S. spontaneum* é composto por um lote básico de 8 cromossomos (x = 8), porém seu número cromossômico varia entre os principais genótipos: 2n = 62, 80, 96, 112 ou 128 (SREENIVASAN et al, 1987; D'HONT et al, 1996). Os cultivares modernos são considerados híbridos alopoliploides, na sua maioria apresentando constituição genômica 2n + n. Estudos de hibridização cromossômica *in situ* permitiram identificar a origem do conteúdo genômico dos cultivares híbridos: concluiu-se que 10-20% de cromossomos são provenientes de *S. spontaneum*, 5-17% de recombinação cromossômica entre as duas espécies parentais e o restante, composto por cromossomos de *S. officinarum* (DE SETTA et al., 2012).

1.3 Biotecnologia em cana-de-açúcar

Experimentos de transformação genética de cana são desenvolvidos há décadas. Conforme revisado por Hotta et al. (2010), o objetivo da produção de plantas de cana transgênicas era incorporar características economicamente importantes, tais como resistência a herbicidas, aumento da concentração de sacarose e tolerância a estresses bióticos e abióticos.

O primeiro trabalho ocorreu em meados dos anos 80, no qual o gene de resistência ao antibiótico canamicina foi introduzido em protoplastos por eletroporação (CHEN, 1987) e posteriormente foi utilizada a técnica de biobalística, que introduziu o

gene em suspensão de células ou calos embriogênicos (BOWER e BIRCH, 1992). No início dos trabalhos de engenharia genética de plantas, foram também gerados eventos transgênicos com resistência ao herbicida glufosinato de amônio (RATHORE et al., 1993). A manipulação do metabolismo de açúcares para maior tolerância a estresses também já se mostrou uma estratégia relevante em cana (ZHANG et al., 2006).

Mais recentemente, plantas de cana transgênicas voltadas à maior tolerância a estresses abióticos foram produzidas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). Por exemplo, plantas transformadas com cassete de expressão controlado por um promotor estresse-responsivo contendo um gene-chave na síntese de prolina, *P5CS,* foram mais tolerantes ao estresse hídrico, provavelmente devido a uma maior estabilidade do sistema fotossintético (MOLINARI et al., 2007), que também ocorre sob estresse salino (GUERZONI et al., 2014). A introdução de um gene-chave no metabolismo de citocininas, *ipt* (isopentiltransferase), controlado por um promotor responsivo a baixas temperaturas, gerou plantas mais tolerantes ao estresse por resfriamento (BELINTANI et al., 2010).

Atualmente, vários trabalhos mostram que a transformação genética de cana-de-açúcar mediada por *Agrobacterium tumefaciens* ou biobalística são suficientemente eficazes para a produção de variedades comerciais, conforme revisado por CHEAVENGATTI-GIANOTTO et al. (2011).

A Comissão Nacional de Biossegurança (CTNBio) aprovou a liberação de mais de 40 eventos transgênicos de cana-de-açúcar para testes em campo. Os transgenes inseridos às cultivares podem aperfeiçoar o desempenho agronômico (tolerância a estresses abióticos, resistência a herbicidas, maior acúmulo de sacarose, etc), bem como reduzir gastos e aumentar os lucros agregados a um produto biotecnológico. Entretanto, até o momento, nenhuma variedade transgênica de cana-de-açúcar foi liberada comercialmente no Brasil, tampouco em outros países (CHEAVENGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

1.4 A cultivar SP80-3280

A cultivar SP80-3280 está entre as 15 variedades mais cultivadas no Brasil, somando quase 80 mil hectares de área plantada (RIDESA, 2012). Ela é mais cultivada na região Centro-Sul do país, onde sua colheita é feita entre os meses de julho a setembro, considerada como colheita média/tardia (RIDESA, 2012). Além disso, as

plantas dessa variedade apresentam resistência a diversos tipos de doenças (carvão, mosaico e ferrugem), embora sejam susceptíveis a broca. A cultivar SP80-3280 é também altamente sensível a herbicidas e exige um alto teor nutricional e hídrico do solo. Embora suporte condições de baixa precipitação, não é considerada tolerante a seca bem como a outros estresses abióticos (AGEITEC, 2005).

Esta cultivar tornou-se referência em estudos moleculares no Brasil. Existem processos de liberação controlada de transgênicos desta variedade desde 1998 (CNTBio, disponível em: http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/232.html). Ela também foi o genótipo de referência para o primeiro projeto brasileiro de sequenciamento de ESTs (do inglês: *Expressed Sequence Tag*) de cana-de-açúcar, o SUCEST (VETTORE et al., 2003).

1.5 Estresses abióticos

Estresses são definidos como fatores externos que exercem uma influência negativa à planta (TAIZ & ZEIGER, 2004). Os efeitos provenientes do estresse geralmente interferem no aumento da biomassa e nos processos de assimilação de gás carbônico (CO_2), água e minerais. Quando a causa do estresse é oriunda das variações climáticas e/ou das características do solo, o estresse é definido como abiótico. Estresses abióticos afetam o desenvolvimento e crescimento vegetal, além de influenciarem nos processos fisiológicos, bioquímicos, morfológicos e moleculares. Déficit hídrico, temperaturas extremas e salinidade do solo são os principais fatores que causam limitações na produtividade agronômica (WANG et al. 2003). Devido ao reflexo das mudanças climáticas, espera-se que a força e o período de ação dos estresses abióticos sejam menos previsíveis e mais severos em um futuro próximo (BAILEY-SERRES et al., 2012) e sua ocorrência simultânea cresça significativamente nas áreas de agricultura (AHUJA et al., 2010).

1.5.1 Estresse hídrico

A deficiência hídrica é a restrição mais importante que ocorre no meio ambiente e afeta o crescimento e o desenvolvimento das plantas, limitando sua produção e rendimento como cultura de maneira mais agressiva que qualquer outro

estresse abiótico (SHAO et al., 2009). O estresse hídrico pode ocorrer por dois processos: se a água for escassa para a absorção da raiz ou se a taxa de transpiração for elevada. Os impactos da redução hídrica incluem o crescimento, produtividade, integridade da membrana, conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, o balanço do potencial hídrico da planta e a atividade fotossintética (ANJUM et al., 2011).

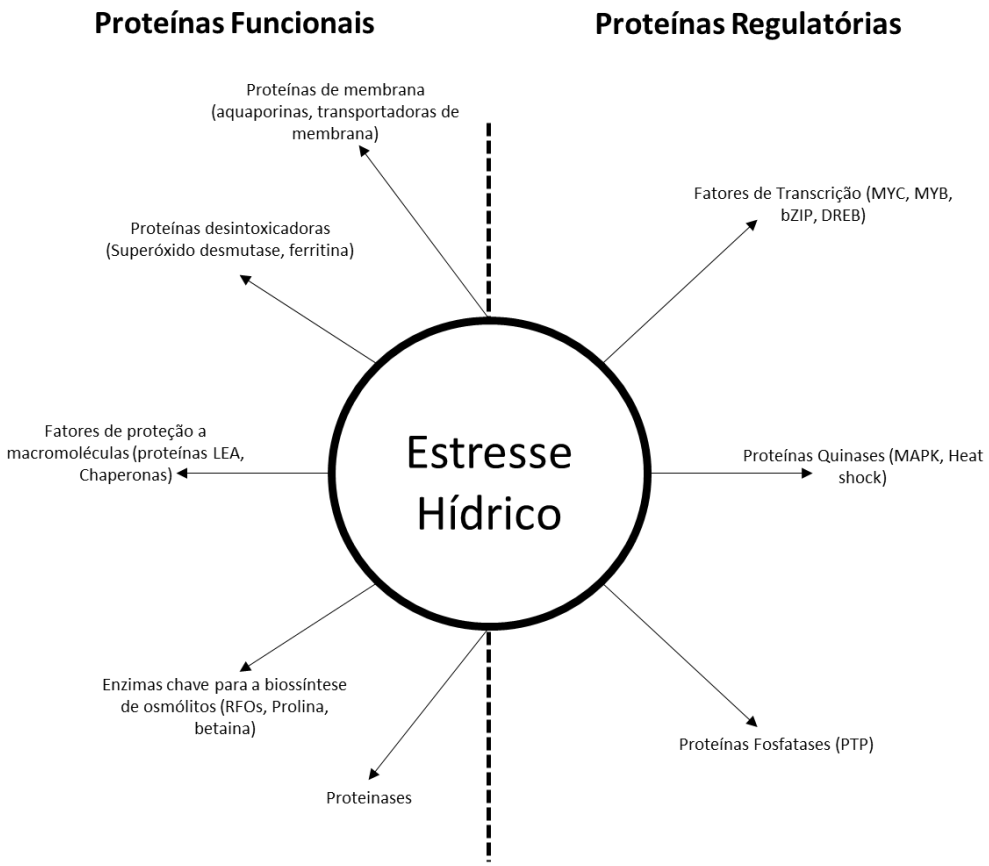
A percepção do déficit hídrico em plantas inicia-se a partir de uma complexa via de sinalização, que desencadeia uma cascata de eventos moleculares e atingem alvos específicos em vias metabólicas e de desenvolvimento. Nos primeiros estágios do estresse, as vias de percepção, sinalização e reprogramação dos genes responsivos são ativadas (HARB et al., 2010). Os fitohormônios (p.ex. ácido abscísico, etileno, ácido salicílico), espécies reativas de oxigênio (ROS) e cascatas fosforilativas, a exemplo das enzimas quinases, são os principais mensageiros de sinalização de estresse em plantas (SHAO et al., 2009; GILL et al., 2010).

A mudança do potencial osmótico através da membrana plasmática pode ser a maior causa de respostas ao estresse hídrico em nível molecular (BRAY, 1993) por ativar diretamente as vias ABA-dependente e ABA-independente que estão relacionadas a manutenção do potencial hídrico intracelular (HARB et al., 2010; NAKASHIMA e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2013). Alterações na conformação da membrana celular podem induzir a atividade de canais de transporte responsivos a variações de pressão, modificando-se a conformação ou a justaposição de proteínas sensoriais intrínsecas às membranas celulares, o que altera o espaço intracelular e lamela média (PÉRES-LÓPES et al., 2009).

Quando as plantas estão em condições de estresse, mensageiros secundários ativam genes que respondem aumentando a concentração de diversos metabólitos e proteínas que aparentam conferir redução no efeito prejudicial oriundo do estresse (ASHRAF et al., 2011). Compreender o metabolismo, bem como as alterações celulares em resposta ao estresse, é o passo chave para o melhoramento genético e produção de plantas com interesse biotecnológico.

Os produtos dos genes induzidos em situações de estresse podem ser classificados em dois grupos, ilustrados na Figura 1: 1) Proteínas funcionais – enzimas, proteínas ou ainda carboidratos que atuam prontamente contra os fatores oriundos de estresse; 2) Proteínas Regulatórias - são produtos que regulam a expressão gênica a níveis de transcrição e a transdução de sinais de resposta ao estresse (SEKI et al., 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Figura 1: Genes induzidos sob estresse hídrico e suas possíveis funções na resposta de tolerância (adaptado de Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000).



1.6 Família dos Oligossacarídeos de Rafinose

Os oligossacarídeos da série da rafinose (RFOs, em inglês *Raffinose Family Oligosaccharides*) são formados pela adição subsequente de moléculas galactosil à sacarose, as quais são doadas por uma molécula de galactinol. Os açúcares não redutores dos RFOs são solutos compatíveis atuantes no mecanismo de tolerância a estresses (SENGUPTA et al, 2008, 2015) e desempenham funções cruciais na célula vegetal, que incluem transporte e reserva de carbono para o metabolismo energético através dos vasos do floema, transdução de sinais (XUE et al. 2007) e transporte de solutos através da membrana celular (THOLE e NIELSEN, 2008). A Figura 2 mostra resumidamente a via de síntese dos RFOs e a Figura 3 mostra a estrutura molecular dos RFOs.

Figura 2: Modelo simplificado da via de síntese dos oligossacarídeos de rafinose. A enzima galactinol sintase, a qual é chave no particionamento da sacarose entre as vias de síntese RFOs e energética, catalisa a reação entre myo-inositol e galactose, gerando galactinol (tracejado em azul). A ação catalítica da rafinose sintase canaliza a sacarose da fotossíntese na via dos RFOs unindo-a a uma molécula de galactinol proveniente do passo anterior da via (tracejado em laranja). A terceira enzima atuante, a estaquiose sintase, adiciona uma molécula de galactinol à rafinose, formando-se a estaquiose, açúcar de quatro carbonos que atua como fonte de esqueleto carbônico para a síntese de RFOs maiores (adaptado de Nishizawa et al., 2008).

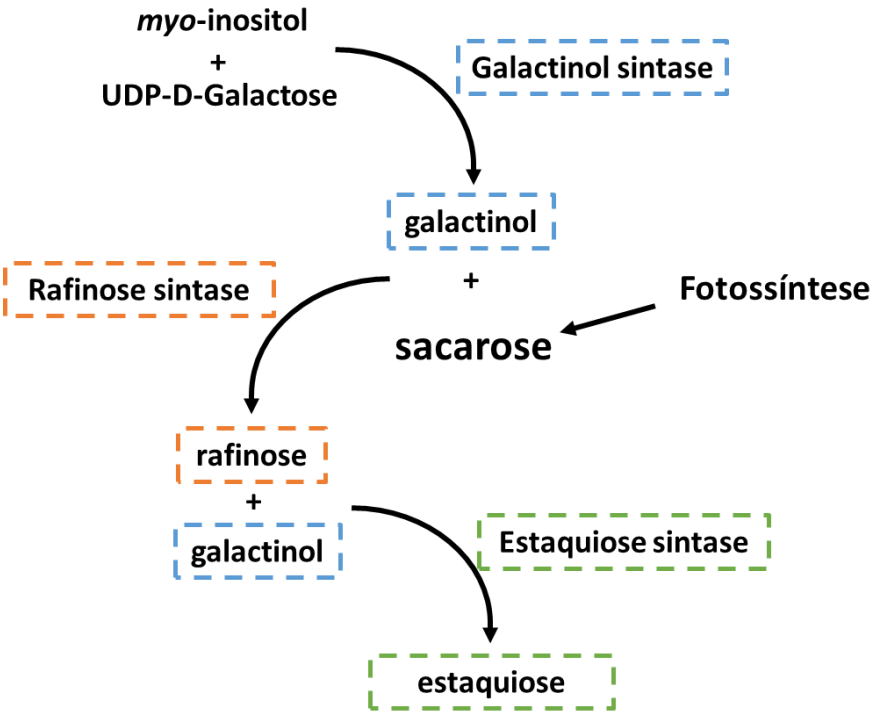
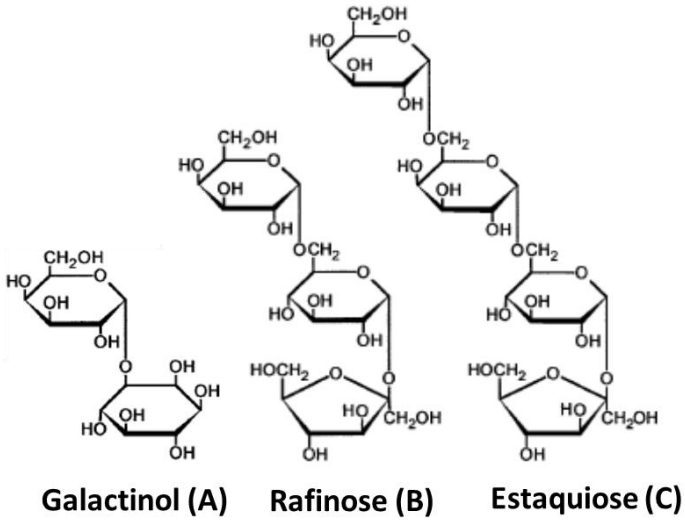


Figura 3: Estrutura das moléculas primárias da via dos RFOs. Galactinol (A), um dissacarídeo que doa seus radicais galactosil para a síntese de Rafinose (B), o qual é um trissacarídeo precursor da via dos RFOs. A estaquiose (C), o terceiro carboidrado formado na via, é um tetrassacarídeo produto do anabolismo entre galactinol e rafinose, que também é substrado para a formação de outros oligossacarídeos maiores, como verbascose, ajulgose e trealose.



1.6.1 Galactinol Sintase

A enzima galactinol sintase (GolS; EC 2.4.1.123) pertence à família glicosiltransferase 8 (GT8), que é composta por enzimas que participam da biossíntese de açúcares envolvidos em vias de sinalização, composição da estrutura celular e reserva energética (SENGUPTA et al., 2012, 2015). A molécula precursora da via bioquímica dos RFOs, o galactinol (Figura 3A), resulta da atividade catalítica da enzima galactinol sintase, que utiliza UDP-D-galactose e uma molécula de mio-inositol para gerar seu produto no citosol (SCHNEIDER e KELLER 2009).

Essa enzima desempenha um processo regulatório chave no metabolismo de açúcares em plantas, particionando o uso do carbono entre as vias de sínteses dependentes de sacarose e RFOs (NISHIZAWA et al., 2008). Por isso, *GolS* é considerado um gene-chave na regulação do metabolismo de RFOs (ELSAYED et al., 2014). Diversas evidências indicam que o gene *GolS* é importante na fisiologia da tolerância a estresses e na translocação dos produtos da fotossíntese (ZHOU et al, 2012).

As sintases de galactinol são codificadas por uma família multigênica. Essa família possui membros de resposta transcricional tecido-específica ou estresse-específica (AMIARD et al, 2003; UNDA et al., 2012; ZHOU et al., 2014). Por exemplo, a galactinol sintase de algodão (*Gossypium hirsutum*) *GhGolS1* apresenta padrão de expressão tecido-específico, pressupondo que a atividade de sua enzima atue como ferramenta chave no metabolismo (ZHUO et al., 2011). A identificação genômica de genes envolvidos no metabolismo da rafinose em milho confirmou que o gene *ZmGolS45.1* (*ZmGolS2*, ZHAO et al., 2004) eleva seu nível transcricional logo após a planta ser reidratada (ZHOU et al, 2012).

Em *Coffea arabica* L., dos Santos et al. (2011) caracterizaram três isoformas do gene galactinol sintase: *CaGolS1*, *CaGolS2* e *CaGolS3*. A análise transcricional de plantas sob estresse hídrico, salino e por alta temperatura mostrou que as isoformas *CaGolS1* e *CaGolS2* apresentam aumento em sua expressão. *CaGolS2* eleva seu nível transcricional ao passo em que o estresse torna-se mais severo, permitindo relacionar a atividade deste gene com a ação dos fatores desencadeados pelo estresse. Entretanto, não foi observada uma relação entre o padrão transcricional das isoformas do gene *CaGolS* e a produção de galactinol. Contudo, outros carboidratos da via dos RFOs, em especial a rafinose, tiveram sua concentração aumentada em resposta ao estresse. Em *Populus trichocarpa*, uma análise genômica identificou nove genes *GolS*, que apresentam padrões transcricionais distintos (ZHOU et al., 2013). Os genes *PtrGolS1-8* foram induzidos em resposta ao déficit hídrico, salinidade do solo e baixas temperaturas.

A superexpressão heteróloga de um gene de galactinol sintase em *Arabidopsis thaliana* resultou em plantas que apresentaram melhor desenvolvimento em condições de estresse salino e hídrico (SUN et al, 2013). Plantas de tabaco transformadas geneticamente com a região codificante do gene *MfGolS1* de *Medicago falcata*, foram mais tolerantes a condições de baixas temperaturas, bem como a déficit hídrico e salinidade, devido ao aumento nas concentrações de açúcares não redutores como rafinose e estaquiose (ZHUO et al., 2013). Utilizada como espécie modelo para monocotiledôneas, plantas de *Brachypodium distachyon* superexpressando o gene *GolS2* de *A. thaliana* (*AtGolS2*) tiveram maior tolerância ao déficit hídrico (HIMURO et al., 2014).

Diante disso, existem diversas evidências, tanto de análises transcricionais como de estratégias de engenharia genética, que a galactinol sintase é um gene importante na resposta a estresses.

1.6.2 Rafinose Sintase

A primeira enzima que catalisa a biossíntese dos carboidratos da família de RFOs é a Rafinose Sintase (RFS; EC 2.4.1.82). Responsável por canalizar a sacarose na via desses açúcares, a RFS retira o radical galactosil do esqueleto carbônico da molécula de galactinol e a transfere para uma de sacarose, formando-se o primeiro açúcar da complexa família de oligossacarídeos: a rafinose (Figura 3B) (SENGUPTA, 2012; TAHIR et al., 2012; DOS SANTOS, 2012)

A enzima RFS foi isolada pela primeira vez em *Vicia faba* (LEHLE e TANNER, 1973) e extraída em *Ajuga reptans* (BACHMANN et al.,1994). A atividade da RFS é bem compreendida no desenvolvimento de sementes (PETERBAUER et al., 2002; ZUTHER et al., 2004; LI et al., 2007), mas sua ação em tecidos fotossintetizantes é muitas vezes ambígua (EGERT et al., 2013). Os genes de rafinose sintase são pouco caracterizados, abrangendo apenas algumas poucas sequencias putativas de espécies como ervilha, arroz, pepino, milho e uva (DIERKING e BILYEU, 2008), e uma extensa avaliação bioquímica apenas em ervilha (PETERBAUER et al., 2002), pepino (SUI et al., 2012), e nos sistemas modelo de arroz (LI et al., 2007) e arabidopsis (EGERT et al., 2013). Os oligossacarídeos de rafinose são utilizados como carboidratos de reserva, e considera-se que a maioria das plantas acumulam ao menos a rafinose. Em algumas espécies, a quantidade varia entre 25-80% do peso seco do órgão fonte, tais como tubérculos, sementes e folhas fotossinteticamente ativas (TAHIR et al., 2012). Também foi proposto que a rafinose auxilia na estabilidade do fotossistema II, pela existência deste açúcar em cloroplastos (KNAUPP et al., 2011)

A rafinose, assim como a estaquiose, são osmoticamente flexíveis, e assim podem facilmente alterar a pressão osmótica celular pela ação de enzimas cíclicas, que quebram as ligações glalactosídicas dos RFOs (SENGUPTA et al., 2015). Em espécies como batata doce e cana-de-açúcar, nas quais a sacarose é utilizada como reserva, a ação osmótica promovida pela translocação dos RFOs pode dobrar a pressão osmótica devido a hidrólise dos carboidratos (GILBERT et al., 1997). Além disso, os RFOs

possuem mobilidade no floema e agem na translocação de carbono através dos vasos quando a molécula é requisitada pelo metabolismo energético.

Paralelo a ação contra os efeitos nocivos do estresse, recentemente comprovou-se por meio de experimentos *in vitro* que a rafinose atua na proteção da membrana plasmática, bem como no sequestro de radicais livres em um padrão dose-dependente. Isso significa que quanto maiores concentrações de rafinose intracelular, menores serão os danos oxidativo por espécies reativas de oxigênio (NISHIZAWA et al., 2008). Essa ação da rafinose foi comparada com compostos fenólicos, os quais são conhecidos por maior efetividade na ação de sequestro de radicais livres (STOYANOVA et al., 2011; PESHEV et al., 2013).

Em cana-de-açúcar, não existiam até o momento estudos voltados a caracterização da produção de rafinose e dos RFOs.

1.6.3 Estaquiose Sintase

A atividade catalítica da estaquiose sintase (STS; EC 2.4.1.67) consiste na adição de radicais galactosil a uma molécula de rafinose para a formar o tetrassacarídeo estaquiose (Figura 3C), o terceiro oligossacarídeo dos RFOs. O papel da estaquiose sintase é regular o balanço nos montantes de galactinol e rafinose produzidos nos pontos anteriores da via dos RFOs, a fim de gerar o carboidrato que servirá como substrato para a formação de outros açúcares como verbascose e ajulgose (HOLTHAUS e SCHMITZ, 1991; HOCH et al., 1999). A STS mantém a membrana plasmática em um estado cristalino durante o estresse de resfriamento, evitando maiores dados as proteínas e lipídios (HINCHA et al., 2003).

A estaquiose é sintetizada nas folhas, raízes e tubérculos, porém na maioria das espécies a síntese de estaquiose está restrita às sementes (TURGEON e WEBB, 1975; PETERBAUER et al., 2002). Além disso, da mesma maneira que as monocotiledôneas que acumulam maiores quantidade de rafinose, as eudicotiledôneas optam pela estaquiose (KUO et al., 1988; HORBOWICZ e OBENDORF, 1994). Entretanto, em ambas superclasses, a estaquiose atua na translocação de solutos através dos vasos do floema, bem como é catabolizado para liberar moléculas de carbono que são utilizadas em vias metabólicas essenciais e como fonte de energia para a germinação (OBENDORF, 1997).

1.7 OBJETIVO

O objetivo geral do presente trabalho foi compreender a relação da galactinol sintase em resposta a estresses e em parâmetros fisiológicos. Para tanto, o trabalho foi dividido em dois capítulos:

Capítulo 1: Genes relacionados a síntese de RFOs em cana-de-açúcar são modulados pelo estresse hídrico

Objetivos específicos:

- caracterizar genes relacionados a síntese dos oligossacarídeos de rafinose nativos de cana de açúcar

- estabelecer relações filogenéticas entre os genes Galactinol Sintase, Rafinose Sintase e Estaquiose Sintase;

- avaliar o padrão transcricional destes genes sob estresse hídrico, avaliando se a restrição hídrica era capaz de alterar os níveis transcricionais destes genes.

Capítulo 2: A galactinol sintase de cafeeiro (*CaGolS2*) pode promover alterações morfológicas e fisiológicas em cana-de-açúcar

Objetivos específicos:

- obter plantas transgênicas de cana-de-açúcar com expressão constitutiva do gene *CaGolS2*

- caracterizar os eventos transgênicos quanto sua morfologia, fisiologia e nível transcricional do transgene *CaGolS2*.

2 CAPÍTULO 1 - Genes relacionados a síntese de RFOs em cana-de-açúcar são modulados pelo estresse hídrico

Introdução

A avaliação dos mecanismos que envolvem o particionamento de carbono e sua influência no acúmulo de sacarose sob condições de estresses abióticos são fundamentais para traçar estratégias no incremento da produtividade em cana-de-açúcar. A família dos oligossacarídeos de rafinose (RFOs) é pouco estudada em monocotiledôneas, embora seja bem compreendida em diferentes espécies de dicotiledôneas por atuar de maneira responsiva frente a diferentes fatores de estresse. Neste contexto, o objetivo geral deste capítulo foi caracterizar genes relacionados a síntese dos oligossacarídeos de rafinose nativos de cana de açúcar, estabelecer relações filogenéticas entre os genes Galactinol Sintase, Rafinose Sintase e Estaquiose Sintase e avaliar o padrão transcricional destes genes sob estresse hídrico, avaliando se a restrição hídrica era capaz de alterar os níveis transcricionais destes genes.

2.1 Materiais e Métodos

2.1.1 Identificação *in silico* de genes envolvidos na produção de RFOs em cana-de-açúcar

2.1.2 Galactinol Sintase, Rafinose Sintase e Estaquiose Sintase

Para anotação dos genes de síntese de RFOs em cana foram selecionados genes anotados nas espécies de *Arabidopsis thaliana, Populus trichocarpa, Sorghum bicolor, Zea mays, Oryza sativa* e *Setaria italica* das plataformas PLAZA (http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/) e TAIR (http://arabidopsis.org). Considerou-se genes Galactinol Sintase apenas as sequências que continham o domínio proteico "*Glycosyl Transferase*" (IPR 002495 e Pfam: 01501) e os motivos "APSAA*" e "KLRIWEFVEY" (DOWNIE et al., 2003). Diferente de *GolS, o*s genes de Rafinose Sintase e Estaquiose Sintase pertencem ao domínio proteico "*Glycosyil hydrosilase*

family 36" (IPR 008811 e Pfam 05691), e as sequencias anotadas necessariamente apresentaram estes domínios.

Estes genes de referência foram comparados contra bases de genoma (http://bce.bioetanol.cnpem.br/ctbeblast#) e transcriptoma de cana-de-açúcar, disponíveis no banco de dados de EST do NCBI e dados de sequenciamento de nova geração (Nishiyama Jr. et al., 2014), utilizando BLAST (http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza_v3_monocots/blast/index) e re-análise de transcriptoma na plataforma TRAPID (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/trapid/trapid). As seqüências de cana foram analisadas no preditor de genes "FGenesh+" (http://softberry.com) e re-montagem de contigs de EST utilizando o "Contig Assembling Program" (http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::cap3).

2.1.3 Análise Filogenética

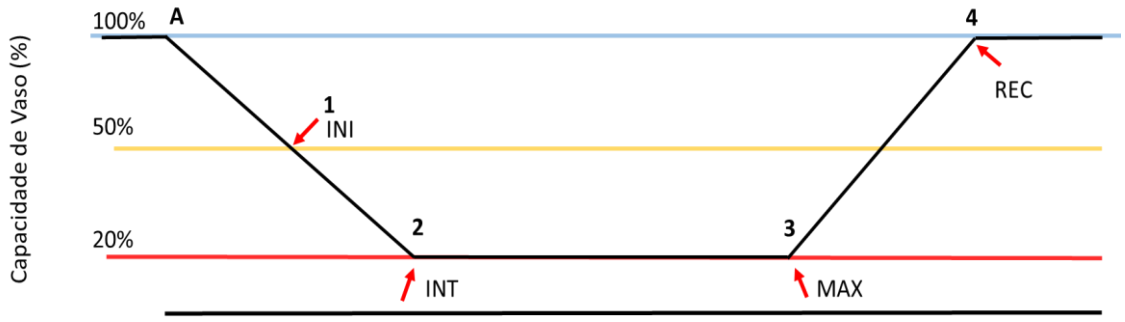
As sequências proteicas completas dos genes *GolS, RFS* e *STS* de cana-de-açúcar foram preditas por meio do software FGENESH+ (SOLOVYEV, et al., 2007) e alinhadas pela ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004) juntamente com as demais sequencias proteicas das espécies vegetais citadas anteriormente. A árvore filogenética foi construída utilizando o softwere MEGA 6 (versão 6.2.56) pelo método de "Maximum likelihood" e *bootstrap* de 1000 réplicas, com deleção de regiões com *gaps*.

2.1.4 Experimento de deficiência hídrica

O experimento de déficit hídrico foi realizado na Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente – SP, visando avaliar se o estresse hídrico foi capaz de modular transcricionalmente genes-chave do metabolismo de RFOs. Quarenta plantas foram obtidas a partir de colmos do terço médio de uma planta matriz de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 de 12 meses de idade, retirada da estação experimental do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). Aos 5 meses de idade, as plantas foram transferidas para vasos plásticos de 20 L contendo solo argiloso vermelho (arenito grupo Bauru), os quais foram irrigados com água por 15 dias. As plantas de cana foram divididas posteriormente em dois conjuntos de 20 plantas cada. Um dos conjuntos teve sua irrigação reduzida a 20% da capacidade de vaso ("plantas

estressadas") e houve coleta em quatro momentos de análise (Figura 4, setas vermelhas): quando a capacidade de vaso de plantas estressadas era de 50% em relação a não-estressadas (**1**, estresse inicial) e em 7, 14 e 21 dias após o início da mudança de irrigação. Sete dias após o início do estresse, as plantas tratadas atingiram 20% da capacidade de campo (**2**, estresse intermediário), que foi mantido por mais 7 dias. No 14º dia (**3**, estresse máximo), a irrigação com 100% da capacidade de vaso foi restabelecida, e houve nova coleta de material vegetal aos 21 dias (**4**, recuperação). Foram coletadas folhas (folha +1) e colmos do terço médio de em réplicas biológicas de 3 plantas estressadas e 3 plantas não-estressadas.

Figura 4: Experimento de déficit hídrico aplicado às plantas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280. Eixo Y, porcentagem (%) do valor da capacidade de campo: linha azul, 100% da capacidade de vaso; linha amarela, 50% da capacidade de vaso; linha vermelha, 20% da capacidade de vaso. Eixo X, pontos de análise avaliados neste trabalho. **A**, ponto inicial do experimento; **1**, estresse inicial (INI); **2**, estresse intermediário (INT); **3**, estresse máximo (MAX); **4**, recuperação (REC).



2.1.5 Parâmetros Fisiológicos

As avaliações fisiológicas deste trabalho foram realizadas com o analisador de gás por infravermelho Li-6400XTR (LiCor, EUA), sob irradiação de 1600 µmol m^{-2} s^{-1} e concentração de CO_2 de 400 ppm. Os parâmetros avaliados foram: assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO_2 (Ci) e transpiração (E). Os parâmetros foram aferidos nos dias de coleta de material em 8 plantas, entre as 8:00h e 10:00h da manhã em triplicatas técnicas.

2.1.6 Análise transcricional: plataforma Illumina

Os genes assim obtidos foram utilizados como referência para mapeamento de reads Illumina do trabalho de VARGAS et al. (2014), que avaliou por RNA-seq a resposta da cultivar SP70-1143 a deficiência hídrica. Para o mapeamento, foram considerados apenas *reads* unicamente mapeados pela ferramenta Bowtie2 (LANGMEAD e SALZBERG, 2012; http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2), no parâmetro estringente.

2.1.7 Análise transcricional por qPCR

As folhas de cana-de-açúcar foram maceradas em nitrogênio líquido e aproximadamente 200 mg do tecido foram utilizados para a extração de RNA, que seguiu a metodologia proposta por Korimbocus et al. (2002). Em seguida as amostras foram tratadas com 1µL de enzima DNase (Ambion, Life Technologies) e submetidas a reação de PCR com *primers* de poliubiquitina de cana para confirmar a ausência de DNA genômico. A concentração e a pureza do RNA foi verificada por espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 – Thermo Scientific) e utilizou-se as amostras que apresentaram razões $A_{260/280nm}$ entre 1,8 e 2,2. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1%.

A síntese de cDNA partiu de 500ng de RNA total (livre de DNA genômico) utilizando o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) de acordo com as instruções do fabricante, em um volume final de 20µL.

O padrão transcricional dos genes relacionados ao metabolismo de RFOs foi avaliado por meio de qPCR, utilizando um termociclador Viia7 (Applied Biosystems). O intercalante utilizado foi LGC® SYBR qPCR Master Mix Rox Plus (LGC) e foi seguido o protocolo recomendado pelo fabricante. As reações de PCR foram conduzidas em triplicatas biológicas, cada uma contendo três replicatas técnicas e como controle foram preparadas reações sem cDNA. As triplicatas biológicas representam *pools* de três plantas em cada ponto de avaliação do experimento. Foi utilizado 15 ng cDNA para cada reação, com um volume total de 10 µl. O programa de amplificação compreende os seguintes passos: 1 ciclo (95º por 5 minutos), 40 ciclos de amplificação, (95ºC por 15 segundos; 64ºC, 60 segundos), posteriormente, foram realizadas curvas de dissociação para verificar a especificidade de amplificação de cada reação.

Os níveis de expressão foram calculados no software ExpressionSuite Software v1.0.3 (Life Technologies), onde o método utilizado para quantificação relativa é baseado em Livak e Schimittgen (2001), pot Ct comparativo em cada ponto de coleta. Dados transcricionais de plantas não-estressadas foram utilizadas como calibrador. O gene normalizador foi a Poliubiquitina, como recomendado por Rocha et al. (2007).

Foram desenhados *primers* (Tabela 1) para a amplificação de fragmentos dos genes alvo com amplicon de aproximadamente 100 pb, utilizando-se o softwere Gene Runner v.5.0.52 (http://www.generunner.net) na metodologia standard. Os *primers* foram sintetizados pela empresa IDT-DNA.

Tabela 1: Sequência dos *primers* desenhados para os genes *GolS, RFS* e *STS* em cana-de-açúcar.

Gene	*Primer Forward*	*Primer Reverse*	Eficiência do Primer (%)	Amplicon
ScGolS1	GGAGAAGGTGAAGGCCGTGC	GTCCCACCACTTCTTCACCAGC	96,52	116 pb
ScRFS1	GAACTTCCCTGACAATGGCATC	GTATGGGAAGCAGGGTCTCTCG	95,00	100 pb
ScSTS1	CATGTTCCAGTCCACGCACC	GGAGCAGCGCGAAGTCGTG	91,54	113 pb
ScPubi	CCGGTCCCTTTAAACCAACTCAG	CCCTCTGGTGTACCTCCATTTG	95,22	105 pb

2.1.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do softwere Assistat (SILVA e AZEVEDO, 2009), versão 7.7 - beta, disponível para download em http://www.assistat.com. O teste partiu de valores paramétricos (teste de normalidade Shapiro-Wilk, $p \leq 0,05$) provenientes de experimento com padrão em parcelas subdivididas (tempo x tratamento) submetendo os dados em análise de variância sob significância de Tukey com p valor a 0,05 e 0,01 ($p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,01$). Para a análise estatística dos experimentos de qPCR, foi utilizado o teste Student-Newman-Keuls (SNK) com significância ao nível de 1% de probabilidade. O coeficiente de variação (C.V) dos dados foram $\leq 20,8$.

2.2 Resultados

2.2.1 Identificação e montagem do gene *ScGolS1*

Por meio da busca por palavra chave com os termos respectivos aos genes *GolS, RFS e STS*, identificou-se os genes RFOs de *Arabidopsis thaliana* disponíveis no TAIR (The Arabidopsis Information Research, arabidopsis.org), e foram identificadas sequências de genes em *Sorghum bicolor* no banco de dados do PLAZA 3.0. No entanto, de todas as sequencias resultantes dessa busca, apenas dois genes completos de *GolS* (*SbGolS1* e *SbGolS2*), cinco genes *RFS* (*SbRFS1, SbRFS2, SbRFS4, SbRFS5 e SbRFS6*), e um gene *STS* (*SbSTS1*) em sorgo foram selecionados para as demais etapas, por serem os únicos a apresentarem todas as características específicas de *GolS, RFS e STS*. O mesmo procedimento foi aplicado às sequências de *Zea mays* (milho)*, Oryza sativa* (arroz)*, Setaria italica, Populus trichocarpa* e *Vitis vinifera* (Figura 6).

A partir da sequência proteica do gene *SbGolS1*, buscou-se sequencias similares ao gene de referência no banco de dados de ESTs de cana (*Sugarcane hybrid cultivar*) disponíveis no NCBI, que são listados na Tabela 2. Diferentemente, os genes *RFS e STS* de cana foram anotados a partir dos dados de transcriptoma do banco de dados SUCEST-FUN (NISHIYAMA et al., 2014) filtrados pelo domínio proteico IPR008811, que resultou em 41 sequencias incompletas, porém passíveis de montagem (Tabela 3). Estes *reads* e sequencias incompletas de transcritos foram submetidos ao software CAP3 para a montagem de *contigs*. Desse procedimento, um contig respectivo ao gene *GolS* e quatro contigs envolvendo os domínios de *RFS e STS* foram montados e submetidos a predição de genes no programa FGENESH+, utilizando-se como referências de similaridade as sequências proteicas de *SbGolS1* (Sb01g037090) para galactinol sintase, *SbRFS1* (Sb07g028620) para rafinose sintase e *SbSTS1* (Sb05g026330) para estaquiose sintase. Apenas os gene *GolS* e *STS* de cana-de-açúcar apresentaram códons de ínicio e término, estando os genes *RFS* incompletos na extremidade 3'. Ao se comparar as sequencias de rafinose sintase com dados genômicos de cana (http://bce.bioetanol.cnpem.br/ctbeblast), foi então possível anotar os transcritos completos. Dessa forma, foram identificados uma sequência de transcrito de galactinol sintase em cana-de-açúcar, o gene *ScGolS1* (Anexo II), três sequencias de rafinose sintase, os genes *ScRFS1-3* (Anexo III), e uma sequência de estaquiose sintase, o gene *ScSTS1* (Anexo IV).

Tabela 2: Identificação de sequências de ESTs de cana-de-açúcar similares à *SbGolS1* e *SbGolS2* no banco de dados do NCBI (*Sugarcane hybrid cultivar*).

SbGolS1 (1539bp)		
Read	**Cobertura**	**Identidade**
BU103705.1	100	95
CA120245.1	67	95
CA261574.1	62	95
CA290168.1	57	95
CA119382.1	59	94
DN194715.1	50	97
CA170616.1	45	95
CA226848.1	45	94
CA290485.1	49	91
CA281359.1	43	93
CA300590.1	36	95
CA280280.1	36	95
DN195127.1	36	95
CA226330.1	47	84
CA226771.1	22	86

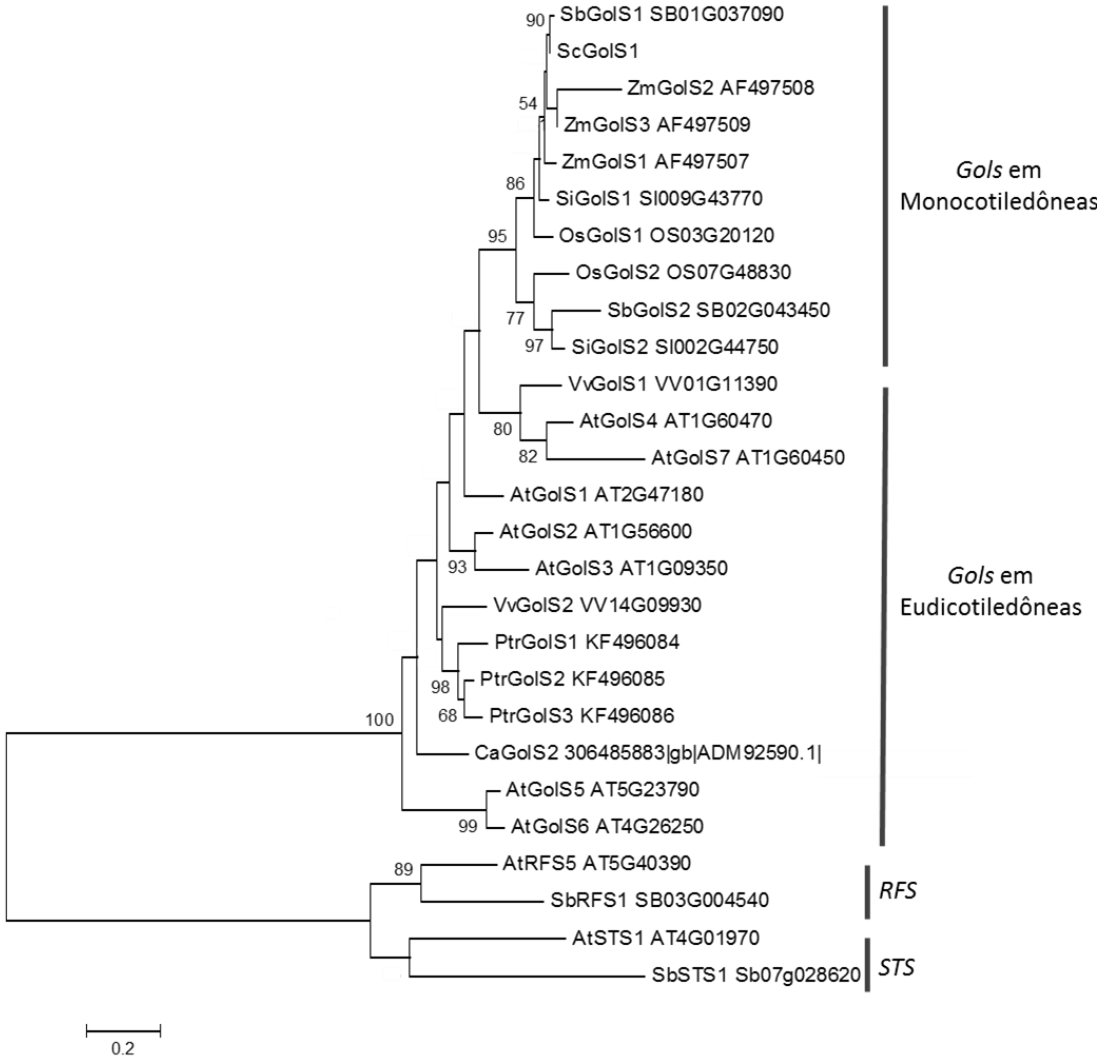
Tabela 3: Transcritos identificados no trabalho de Nishiyama et al. (2014).

Identificação do transcrito (Nishiyama et al., 2014)	**Número de ESTs**	**Gene**	**Integridade da sequência**
comp86969	26	ScRFS1	Incompleta
comp88933	9	ScSTS1	Completa
comp85248	6	ScRFS2	Incompleta

2.2.1.1 Análise Filogenética de Galactinol Sintase

Os dados obtidos permitiram dividir genes *GolS* de plantas monocotiledôneas e eudicotiledôneas, evidenciando o caráter monofilético dessa família gênica (Figura 5). Os motivos característicos de GolS permitem inclusive distinguir esta enzima de outras glicosiltransferases envolvidas na síntese de RFOs.

Figura 5: Árvore filogenética de sequencias proteicas de *GolS*. As sequências foram alinhadas pelo programa MUSCLE e a árvore foi desenhada pelo método de "Maximum Likelihood"no programa MEGA versão 6.2.53, com *bootstrap* de 1000 réplicas. As porcentagens de *bootstrap* acima de 50% estão indicadas em cada ramificação da árvore.

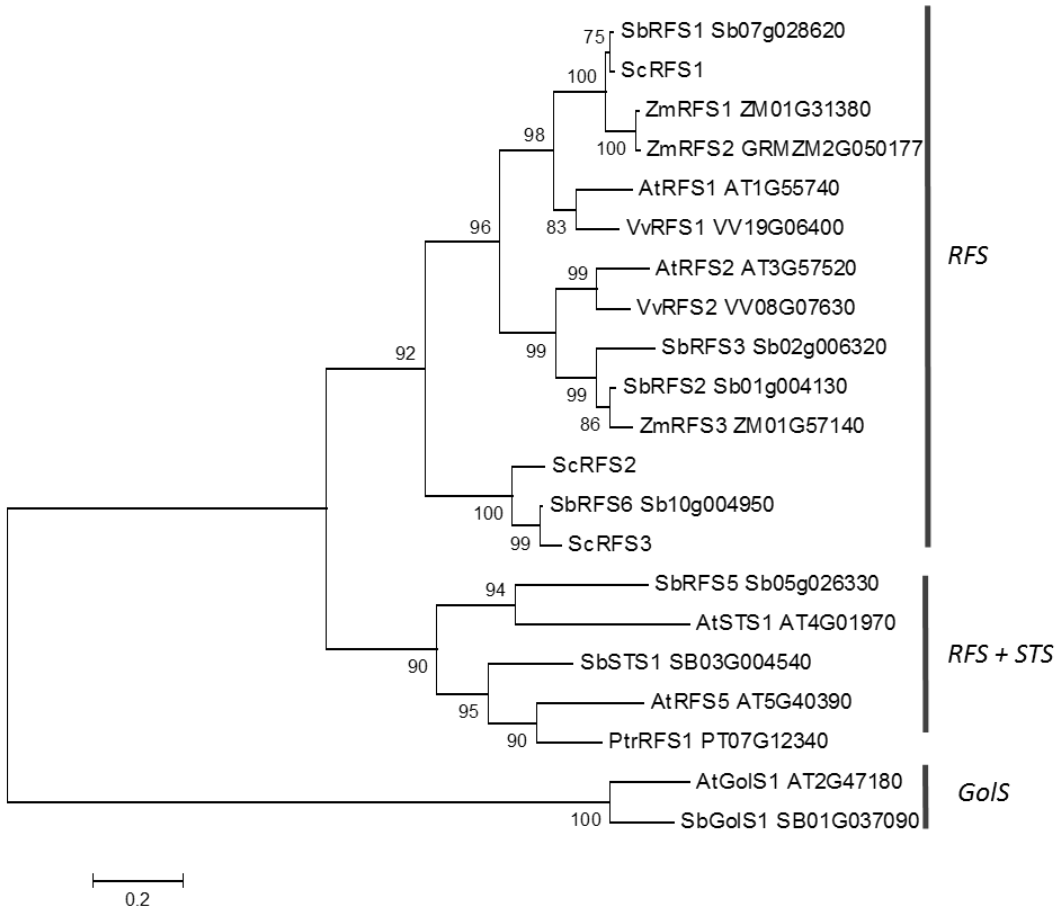


2.2.1.2 Análise Filogenética de Rafinose Sintase em cana-de-açúcar

A análise filogenética de rafinose sintase não evidenciou clados específicos que permitam a distinção entre os genes RFS de monocotiledôneas e eudicotiledôneas, sugerindo padrões distintos de evolução em RFS quando comparados a GolS, provavelmente devido a intensidades distintas de seleção (Figura 6), já especulado por Sengupta et al. (2015). Observa-se, ainda assim, uma tendência de convergência entre os genes *S. bicolor, Z. mays* e cana-de-açúcar, bem como a maior proximidade

filogenética entre *A. thaliana, V. vinifera* e *P. trichocarpa*, todos apoiados por valores consistentes de *bootstrap*.

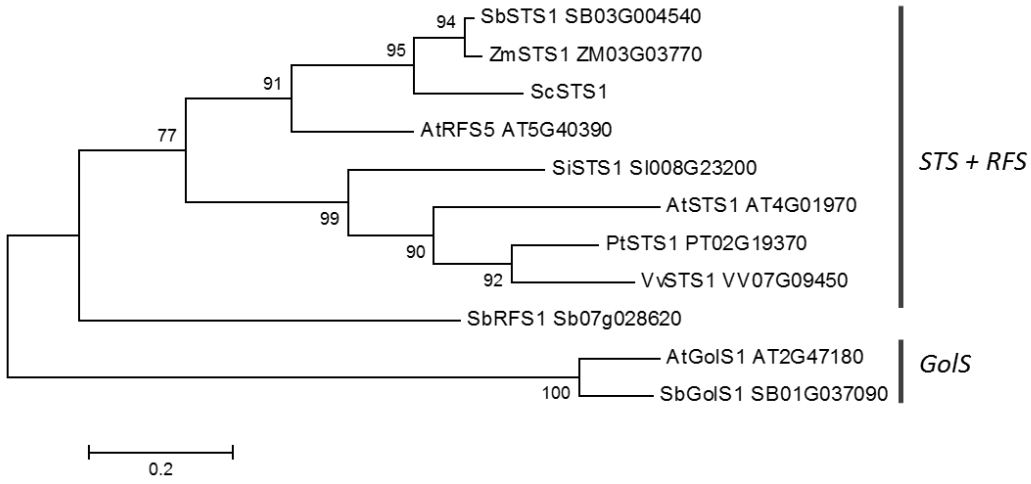
Figura 6: Arvore filogenética construída a partir de sequencias proteicas de RFS. As sequências foram alinhadas pelo programa MUSCLE e a árvore foi desenhada pelo método de "Maximum Likelihood" no programa MEGA versão 6.2.53, com *bootstrap* de 1000 réplicas. As porcentagens de *bootstrap* acima de 50% estão indicadas em cada ramificação da árvore.



2.2.1.3 Análise Filogenética de Estaquiose Sintase em cana-de-açúcar

Com valores de *bootstrap* elevados, a árvore filogenética de Estaquiose sintase (Figura 7) exibe os genes de plantas monocotiledôneas e eudicotiledôneas no mesmo clado, respeitando-se apenas a diferença de função bioquímica entre as enzimas. Análises mais detalhadas poderão responder se os padrões evolutivos dessa enzima são similares a galactinol sintase.

Figura 7: Árvore filogenética construída a partir de sequências proteicas de STS completas, alinhadas pelo programa MUSCLE pelo método de "Maximum Likelihood" no MEGA versão 6.2.53 com *bootstrap* de 1000 réplicas. As porcentagens de *bootstrap* estão indicadas em cada ramificação da árvore.



2.2.2 Avaliação fisiológica sob estresse hídrico

A fotossíntese está entre os processos primários que são afetados pelo estresse hídrico (CHAVES et al., 1991). Os valores de fotossíntese mantiveram-se estáveis desde o início do experimento de estresse hídrico no conjunto de plantas controle, enquanto que a atividade fotossintética nas plantas estressadas foi 53% menor do ponto de análise INT, e manteve-se neste padrão até o fim do experimento (Figura 8A).

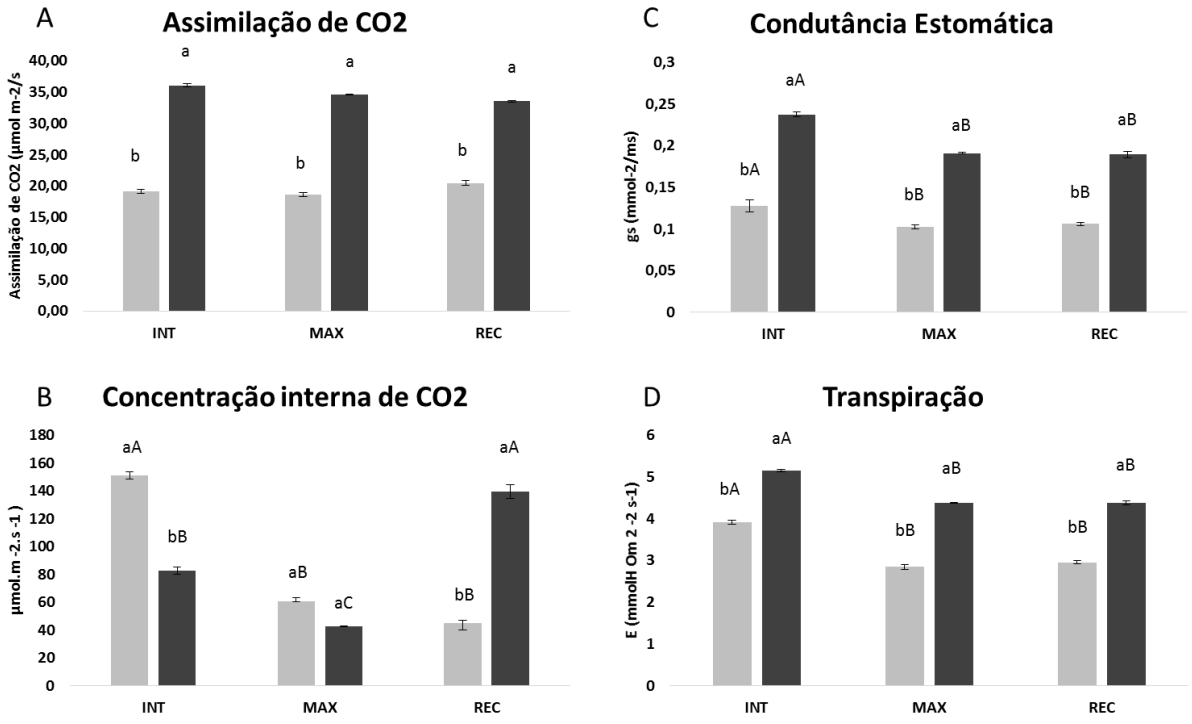
A concentração interna de CO_2 traduz a disponibilidade dessa molécula no tecido foliar para o metabolismo energético. Na Figura 8B, observa-se a redução no conteúdo de gás carbônico nas plantas estressadas de acordo com o período de restrição hídrica.

Como observado da Figura 8C, a condutância estomática nas plantas sob estresse foi 46,24% menor que as plantas controle já em estresse inicial e um acréscimo de 3% neste parâmetro foi registrado quando as plantas sob estresse foram reidratadas. O decréscimo na condutância estomática em ambos os tratamentos pode ser explicada pela redução da umidade relativa interna do casa de vegetação na qual o experimento foi conduzido (dados não apresentados).

Como observado na Figura 8D, os níveis de transpiração das plantas sob estresse hídrico foi 24% menor em INT, e 34% em MAX. Isso sugere que, mesmo

havendo reidratação do solo, a taxa de transpiração demora para restabelecer seu padrão.

Figura 8: Avaliações fisiológicas do experimento de estresse hídrico. As barras claras representam as plantas estressadas e a barras escuras representam as plantas não-estressadas. Legenda: A) Assimilação Líquida de CO_2; B) Concentração interna de CO_2; C) Condutância Estomática; D) Transpiração. No eixo X estão indicados os pontos de avaliação em estresse intermediário (INT), máximo (MAX) e reidratação (REC). Letras maiúsculas demonstram diferença estatística entre os pontos INT, MAX e REC, e letras minúsculas expressa a diferença entre tratamentos (plantas sob estresse x plantas não-estressadas). Foi aplicado o teste estatístico de Tukey com p valor a níveis de significância igual ou menor a 1% ($p \leq 0,01$).



O fechamento estomático é o primeiro processo fisiológico em resposta ao estresse hídrico por evitar a perda de água através das folhas (CHAVES et al., 2003). Em cana-de-açúcar, a redução de condutância estomática varia em função do cultivar avaliado e a sua sensibilidade ao estresse (SANTOS e SILVA, 2015). Graça et al. (2010) e Santos et al. (2012) observaram a redução da condutância estomática em cultivares de cana quando em déficit hídrico, considerando-os sensíveis à restrição de água. Entretanto, outros trabalhos mostram que as taxas de trocas gasosas, bem como a assimilação de CO2 (A), concentração interna de CO2, condutância estomática (gs) e transpiração (E) são significativamente reduzidas tanto nos cultivares sensíveis quando

nos tolerantes a estresse hídrico (JIFON et al., 2015; SALES et al., 2013, 2015), concluindo que a homeostase da maquinaria fotossintética é afetada pelo estresse hídrico.

Os parâmetros fisiológicos aqui apresentados estão de acordo com a literatura. A redução da condutância estomática (Figura 8C) e da concentração interna de CO_2 (Figura 8B) indicam que o de gás carbônico no interior da célula é consumido ao longo do estresse, e a não reposição desta molécula pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) corrobora com a redução da assimilação líquida de CO_2 (Figura 8A) e transpiração (Figura 8D). Sales et al (2015) também observaram que os parâmetros fotossintéticos são prejudicados devido a alterações na atividade bioquímica das enzimas neste processo.

A baixa umidade do solo causa a perda excessiva de água nas folhas leva ao fechamento significativo dos estômatos a fim de manter o potencial hídrico foliar e o turgor das células (LAWLOR e TEZARA, 2009). Além disso, o fluxo drasticamente reduzido das moléculas gasosas de água através do estômato aumenta a temperatura foliar, o que ocasiona o quadro de fotoinibição (SANTOS et al., 2014). Ainda, a redução das atividades fisiológicas podem ser causadas pela baixa concentração interna de CO_2, devido a sua difusão pelo mesofilo, o que prejudica a fotossíntese ou ainda pela ação das espécies reativas de oxigênio, que podem afetar seriamente a maquinaria fotossintética (FLEXAS et al., 2007; SANTOS et al., 2014).

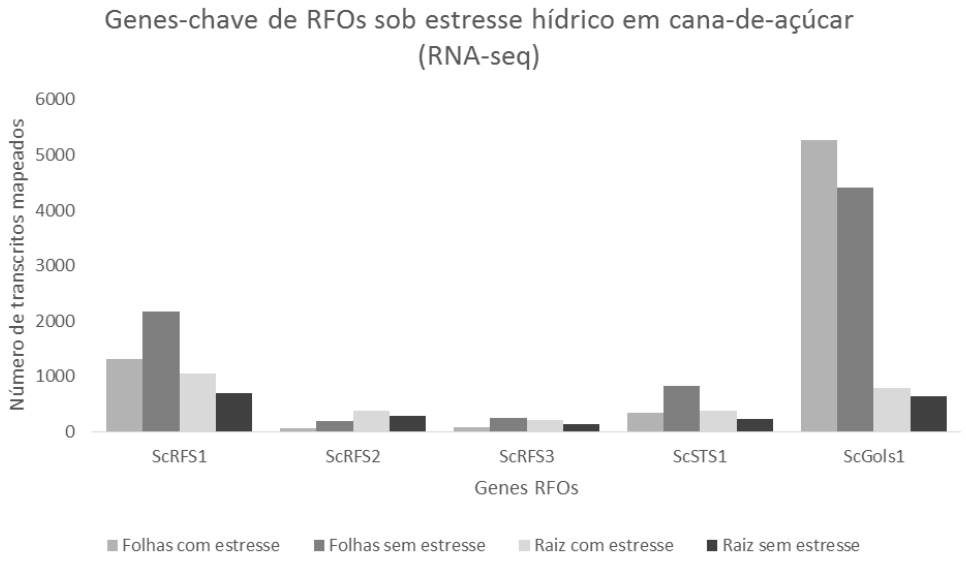
2.2.3 Avaliação transcricional *in silico* do genes RFOs em cana

Os genes avaliados apresentaram modulação sob estresse hídrico nas raízes e folhas – a maioria deles foi reprimida pelo estresse hídrico em folhas e induzidos em raiz, com exceção de *ScGolS1* (Figura 9).

Em folhas, o gene com maior número de *reads* mapeados foi *ScGolS1*, que foi o único a ser induzido transcricionalmente sob estresse. Entre as rafinose sintases, *ScRFS1* é a que tem a maior redução transcricional em tecidos fotossintetizantes quando submetidas ao estresse, indicando ser a mais importante para a produção desse RFO.

A avaliação do padrão transcricional dos genes de síntese de RFOs permite inferir na adaptação a restrição hídrica em diferentes tecidos vegetais, abrindo a possibilidade de avaliar se estas respostas aqui observadas se repetem em outros genótipos de cana-de-açúcar.

Figura 9: Mapeamento de *reads* Illumina nos genes *ScGolS1, ScRFS1-3* e *ScSTS1* utilizando os dados de RNA-seq de cana-de-açúcar da variedade SP70-1143 provenientes do trabalho de VARGAS et al. (2014).



2.2.4 Avaliação transcricional dos genes relacionados a síntese RFOs sob estresse hídrico

2.2.4.1 Galactinol Sintase

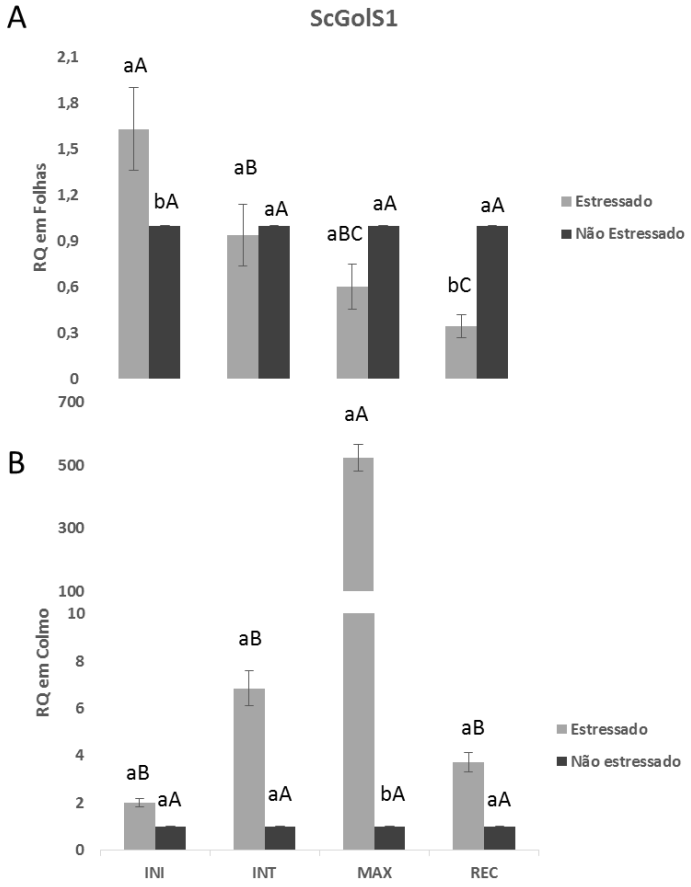
As sintases de galactinol usualmente eleva seu nível transcricional de acordo com origem e a severidade do estresse abiótico (ELSAYED et al., 2014; SENGUPTA et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2011). De acordo com o nível transcricional dessas isoformas frente a estresses, foram identificados padrões responsivos diferentes e específicos a cada uma das isoformas de uma mesma espécie (TAJI et al., 2002; DOS SANTOS et al., 2011; KIM et al., 2011; UNDA et al., 2012; WANG et al., 2012; ZHOU et al., 2014; GOJLO et al., 2015). Este trabalho anotou uma isoforma de galactinol sintase em cana (*ScGolS1*) e avaliou seu padrão transcricional sob estresse hídrico (Figura 14).

Em oposição ao observado para outros sistemas vegetais, em sua maioria dicotiledôneas, a regulação transcricional de *GolS* em folhas sofreu repressão ao longo do estresse (Figura 10A). Uma hipótese que pode explicar o ocorrido é que a isoforma *ScGolS1* pode responder prontamente ao déficit hídrico, uma vez a capacidade hídrica do vaso no ponto de avaliação INI é de 50%, após três dias sem irrigação.

Adicionalmente, a repressão do gene *GolS* nos pontos INT e MAX pode ser correlacionada a degradação de RFOs mais complexos em RFOs menores e sacarose, açúcar de valor energético que estará novamente disponível no tecido foliar.

O nível transcricional de *ScGolS1* também foi avaliado em internós do terço médio e mostrou padrão distinto ao observado em folhas. *ScGolS1* eleva seu nível transcricional ao longo do estresse, com sua maior indução no estresse máximo (Figura 10B). A fim de complementar os resultados obtidos na avaliação transcricional, será importante correlacionar a expressão do gene com a quantificação de oligossacarídeos. Isso permitiria evidenciar o impacto da atividade dos genes no balanço de carbono em cana sob estresse hídrico.

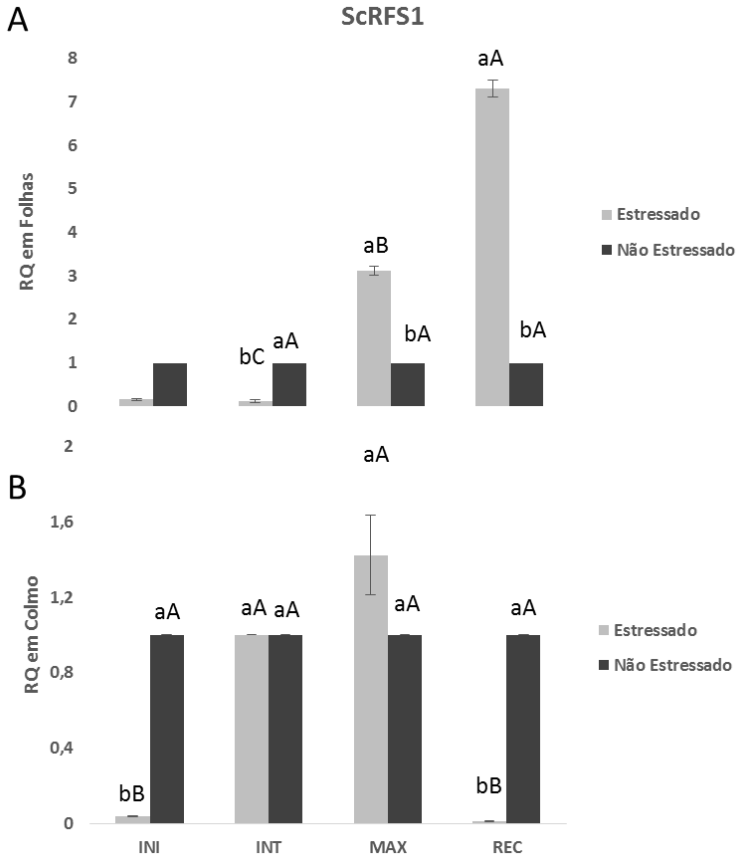
Figura 10: Nível transcricional de *ScGolS1* em estresse hídrico. A) quantificação relativa em folhas +1; B) quantificação relativa em colmo da porção média. Estresse – plantas irrigadas em 20% da capacidade de campo; Controle – plantas com irrigação inalterada. INI – inicial; INT – intermediário; MAX – máximo; REC – recuperação (reidratação). Letras estatística pelo teste SNK a 0,01% de significância. Letras maiúsculas mostram diferença entre os pontos de avaliação INI, INT, MAX e REC, e letras minúsculas mostram a diferença entre o nível transcricional entre o gene *GolS* entre os tratamentos de estresse hídrico e irrigado.



2.2.4.2 Rafinose Sintase

O acúmulo de rafinose em plantas pode ser atribuída a atividade do gene rafinose sintase. Esse gene é pouco compreendido em tecidos fotossintetizantes, pois geralmente sua maior atividade é observada em frutos e sementes (SENGUPTA et al., 2012; TAHIR et al., 2012). Em folhas de cana (Figura 11A), a rafinose sintase eleva o nível transcricional de acordo com a severidade do estresse. Em contraponto, em colmo (Figura 11B), a *ScRFS1* tem sua transcrição claramente reprimida no ponto INI e a partir de INT apresenta um padrão responsivo ao estresse, elevando seu nível transcricional até MAX.

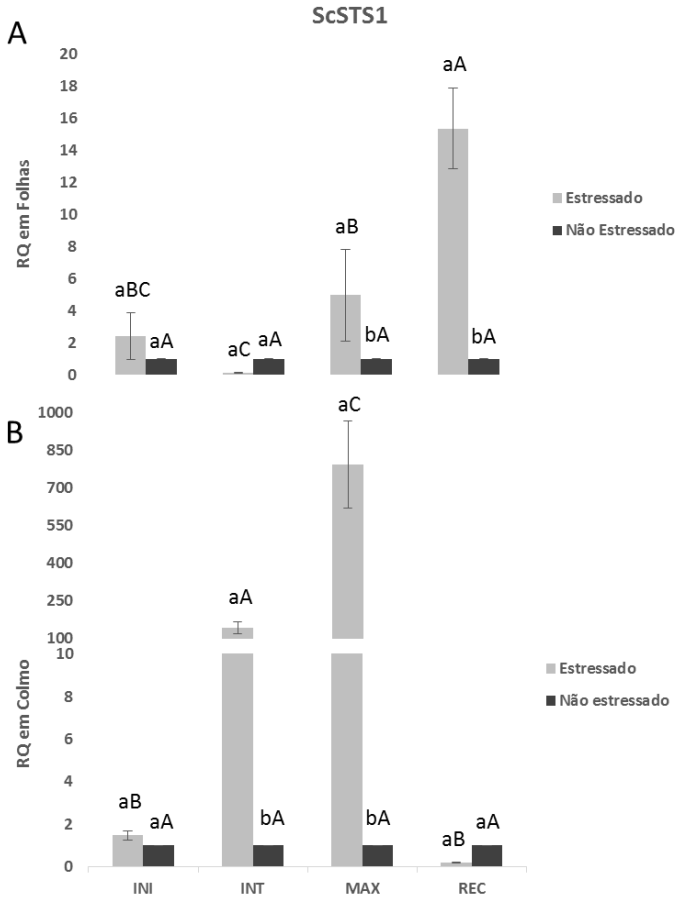
Figura 11: Nível transcricional de *ScRFS1* em estresse hídrico. A) quantificação relativa em folhas +1; B) quantificação relativa em colmo do terço médio. Estresse – plantas irrigadas em 20% da capacidade de campo; Controle – plantas com irrigação inalterada. INI – inicial; INT – intermediário; MAX – máximo; REC – recuperação (reidratação). Letras estatística pelo teste SNK a 0,01% de significância. Letras maiúsculas mostram diferença entre os pontos de avaliação INI, INT, MAX e REC, e letras minúsculas mostram a diferença entre o nível transcricional de *RFS* entre os tratamentos de estresse hídrico e irrigado.



2.2.4.3 Estaquiose Sintase

O oligossacarídeo estaquiose é sintetizado a partir de galactinol e rafinose em uma reação catalisada pela estaquiose sintase. Seu acúmulo em situações de estresse abiótico é relatado com maior frequência em sementes (PETERBAUER et al., 2002). A expressão da estaquiose sintase em folhas sofre repressão no período que compreende os pontos de análise INI e INT, porém em MAX é induzida e mantém este padrão em REC (Figura 12A). Assim como observado para o gene *ScGolS1* e *ScRFS1*, a transcrição do gene *ScSTS1* em colmo é responsiva ao estresse hídrico, como observado na Figura 12B.

Figura 12: Nível transcricional de *ScSTS1* em estresse hídrico. A) quantificação relativa em folhas +1; B) quantificação relativa em colmo do terço médio. Estresse – plantas irrigadas em 20% da capacidade de campo; Controle – plantas com irrigação inalterada. INI – inicial; INT – intermediário; MAX – máximo; REC – recuperação (reidratação). Letras estatística pelo teste SNK a 0,01% de significância. Letras maiúsculas mostram diferença entre os pontos de avaliação INI, INT, MAX e REC, e letras minúsculas mostram a diferença entre o nível transcricional de *STS* entre os tratamentos de estresse hídrico e irrigado.



2.3 Discussão

Os genes e as enzimas responsáveis pela síntese de RFOs são encontrados apenas nas plantas superiores (SENGUPTA et al., 2015) e seu auxílio na translocação de solutos através do floema faz dessa família de carboidratos um importante contribuinte no fator de tolerância a estresses (ELSAYED et al., 2013). A maioria desses trabalhos foram desenvolvidos em espécies eudicotiledôneas. Sua função predominante envolve aspectos de tolerância a estresses abióticos devido ao padrão estresse-responsivo dos genes chave de síntese dos RFOs, que alteram os níveis desses açúcares na célula vegetal. Até o momento, existem poucos genes de síntese dos RFOs caracterizados em monocotiledôneas, com os resultados mais relevantes observados em milho (ZHOU et al., 2012). A caracterização de genes em cana-de-açúcar é um desafio devido à pouca informação genômica disponível em banco de dados públicos. Neste trabalho foram apresentados cinco genes relacionados a síntese de RFOs em cana-de-açúcar, anotados utilizando metodologias *in silico*: *ScGolS1* (Sugarcane Galactinol Sintase 1)*, ScRFS1-3* (Sugarcane Rafinose Sintase 1-3) e *ScSTS1* (Sugarcane Estaquiose Sintase 1). Três genes (*ScGolS1, ScRFS1* e *ScSTS1*) tiveram seu nível transcricional avaliado em condições de estresse hídrico

A árvore filogenética de *ScGolS1* (Figura 5) mostra que o gene de galactinol sintase segue um padrão monofilético, dividindo a árvore em dois clados principais: I - GolS em monocotiledôneas e; II – GolS em eudicotiledôneas. Essa ramificação sugere que os genes *GolS* diversificaram-se juntamente com as espécies. Além disso, os motivos de *GolS* permitem diferenciá-la evolutivamente de RFS e STS, que também são glicosiltransferases da via dos RFOs. Entretanto, os genes de rafinose e estaquiose sintase são muito próximos filogeneticamente, variando em apenas alguns poucos conjuntos de aminoácidos que diferem o sítio catalítico específico das enzimas. Essa similaridade fica evidente nas árvores filogenéticas das Figuras 6 e 7, nas quais não é observado agrupamentos monofiléticos independentes entre os genes *RFS* e *STS*, diferentemente de *GolS*. De fato, RFS e STS não exibem um padrão de evolução espécie-específico, levando –se a pensar que mecanismos de duplicação e recombinação possam ter atuado neste processo.

A sacarose é uma forma primária de carbono reduzido que é sintetizada no citoplasma e transportada por longas distâncias no floema, oriunda da fotossíntese ou de reservas enegéticas de carbono. Este açúcar tem a capacidade de fluir livremente entre

as células do mesofilo por meio dos plasmodesmos (PD) por meio de fluxo simplástico até atingir os vasos menores do floema no qual será transportada a longas distâncias através dos elementos de vaso, que são movimentados por fluxo de massa. O fluxo de massa ocorre quando a diferença do potencial hidrostático é grande o suficiente para gerar um fluxo contínuo dos solutos através dos vasos do floema no sentido fonte – dreno, força essa que é primeiramente energizada pelo acúmulo de solutos no floema dos tecidos fonte (folhas fotossintetizantes), fenômeno conhecido como carregamento do floema (YADAV et al., 2015). Existem diferentes mecanismos para o carregamento do floema: I - carregamento apopástico (ativo); II - carregamento por mecanismo de captura de polímeros e; III - carregamento simplástico (passivo).

Plantas de cana-de-açúcar utilizam o mecanismo de carregamento apoplástico do floema (ROBINSON-BEERS e EVERT, 1991). Nesse processo, a sacarose é transportada por meio de proteínas de membrana SWEET para as células adjacentes do floema. Devido à grande pressão osmótica existente nessas células, a sacarose adentra ao vaso condutor contra o gradiente osmótico por transporte ativo, onde finalmente é transportada pelo fluxo de massa para os tecidos dreno (BRAUN e SLEWINSKI, 2009; YADAV et al., 2015). Levando em conta esses mecanismos, sob os efeitos do estresse hídrico a cana poderia utilizar o mecanismo de captura de polímeros para auxiliar o carregamento do floema. Essa mudança de estratégia também já foi observada em plantas de melão, especialmente sob ação de vírus (GIL et al., 2011). Nesse mecanismo, a sacarose flui simplasticamente do mesofilo para as células adjacentes ao floema através de plasmodesmos especializados. Nessas células, uma parte da sacarose é imediatamente convertida em oligossacarídeos de rafinose, principalmente em forma de rafinose e estaquiose (TURGEON e AYRE, 2005). Assume-se que esses PDs exerçam seleção semipermeável dos solutos, impedindo que grandes esqueletos carbônicos como os RFOs atravessem seus canais. Dessa forma, os RFOs sintetizados nas células adjacentes ali permanecem e por consequência, elevam a pressão osmótica e o fluxo de massa em direção ao floema, permitindo que a seiva flua para os tecidos dreno (McCASKILL e TURGEON, 2007).

Essa hipótese é reforçada pelo padrão transcricional dos genes chave de síntese dos RFOs em cana observados no presente trabalho. Na Figura 10A, *ScGolS1* eleva seu nível transcricional nas folhas no início do estresse (INI) e sofre posterior repressão ao longo dos pontos INT, MAX e REC. A indução de *GolS* implica no aumento dos níveis de galactinol, o qual será molécula substrato para as enzimas

subsequentes da via metabólica. Ao mesmo tempo, a partir do ponto INT, *ScRFS1* e *ScSTS1* passam a ter transcrição induzida pelo estresse (Figura 11A e 12A), sugerindo que as moléculas de galactinol sintetizadas no início do estresse agora estão convertendo-se em RFOs maiores pela atividade das enzimas RFS e STS. Ainda, em colmo, os *ScGolS1, ScRFS1* e *ScSTS1* elevam sua transcrição de acordo com a severidade do estresse (Figuras 10B, 11B e 12B). Isso sugere que os RFOs sintetizados nas folha não são transportados para o floema junto com a sacarose, o que também foi observado em outras espécies que utilizam o mecanismo de carregamento apoplástico (YADAV et al., 2015) e por este motivo, os RFOs são sintetizados novamente em colmo. Turgeon et al. (2001) e Ayre et al. (2003) chegaram a uma conclusão semelhante quando avaliaram a regulação aumentada do gene de rafinose sintase em plantas de tabaco, nos quais foi evidenciado a presença de RFOs no floema, sugerindo que as sínteses desses oligossacarídeos estejam também relacionadas aos tecidos adjacentes ao feixe vascular. Nas Figuras 10B, 11B e 12B, observa-se que a indução do gene *GolS* e *STS* é maior que o de *RFS*. Sugere-se que o nível elevado de *GolS* se deve ao fornecimento de galactinol para a síntese de rafinose e também estaquiose nos passos subsequentes da via, bem como a estaquiose sintase que é induzida para sintetizar maiores quantidades de estaquiose, possivelmente para elevar a concentração de seu produto em colmo. É importante ressaltar que, além do exposto acima, a atividade dessas enzimas, e por consequência a transcrição do gene, pode ser maior em colmo devido à grande disponibilidade de sacarose nesse tecido, molécula a qual é utilizada como esqueleto carbônico para a produção dos oligossacarídeos de rafinose. O acúmulo de RFOs nos colmos de cana-de-açúcar, além de contribuir para o fluxo de massa de solutos do tecido fonte para o dreno, deve aumentar o potencial hídrico do colmo, o que ocasionaria uma maior absorção de água e nutrientes através das raízes.

Assim como já foi observado em outras espécies, os genes-chave relacionados a síntese de RFOs em cana possivelmente exercem um papel fundamental na tolerância a estresses abióticos. Os genes não respondem de maneira idêntica ao estresse, observando-se respostas tecido e estresse específicas. Com base nos dados obtidos, concluímos que a regulação de síntese da estaquiose e a rafinose podem ser tão ou mais importantes que o galactinol na tolerância a estresses, abrindo a perspectiva de experimentos que avaliem em detalhe a participação específica de cada um desses polissacarídeos na tolerância ao estresse hídrico.

3 CAPÍTULO 2 - A galactinol sintase de cafeeiro (*CaGolS2*) pode promover alterações morfológicas e fisiológicas em cana-de-açúcar

Introdução

O cultivo de cana-de-açúcar passou a ter grande relevância nos últimos anos devido a importância de seus subprodutos como fontes geradoras de energia. Neste contexto, o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas em cana que gerem maior capacidade de tolerância a estresses passaram ser de grande importância. Uma estratégia utilizada para este fim é a transformação genética com enzimas chave para a síntese de osmólitos. A enzima galactinol sintase (GolS, EC 2.4.1.123) forma moléculas de galactinol, a qual é precursora da via dos oligossacarídeos de rafinose (RFOs). Os RFOs atuam como moléculas antioxidantes e de regulação osmótica em diferentes espécies. Em *Coffea arabica*, um trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa caracterizou três isoformas de galactinol sintase em *Coffea arabica*, e foi observado que o gene *CaGolS2* apresentava indução transcricional em resposta ao estresse hídrico.

Isso posto, o objetivo deste trabalho foi obter plantas transgênicas de cana-de-açúcar com expressão constitutiva do gene *CaGolS2,* bem como caracterizar os eventos transgênicos quanto sua morfologia, fisiologia e nível transcricional do transgene *CaGolS2*.

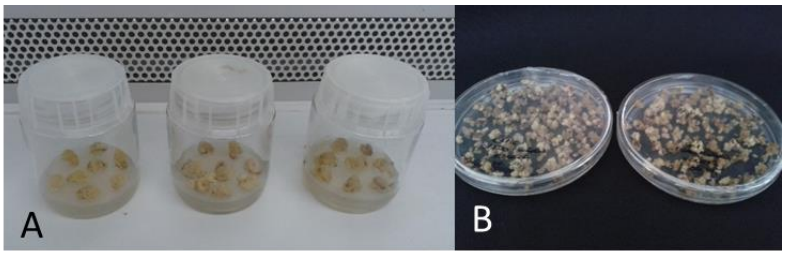
3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Material vegetal e cultura de tecidos

Foram utilizadas como fonte dos explantes plantas de cana-de-açúcar com dez meses de idade da variedade SP80-3280, cultivada no campo da estação experimental do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR, Londrina, PR). Segmentos de folhas imaturas foram desinfestados superficialmente com etanol 70% (3 vezes por 2 minutos) e hipoclorito de sódio a 50% da concentração comercial (2,5% p/p) por 20 minutos. A região meristemática foi cortada transversalmente em discos de 2-3 mm e transferidas para potes de vidro de 250 mL contendo 40mL de meio de indução MS (MURASHIGE e SKOOG) modificado por Bower et al. (1996), suplementado com 25 g/L de sacarose, 150 mg de ácido cítrico, 13 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-

D) e solidificado com 3 g/L de phytagel (Sigma). Os explantes foram mantidos no escuro a 27°C para a indução de calos embriogênicos (Figura 13).

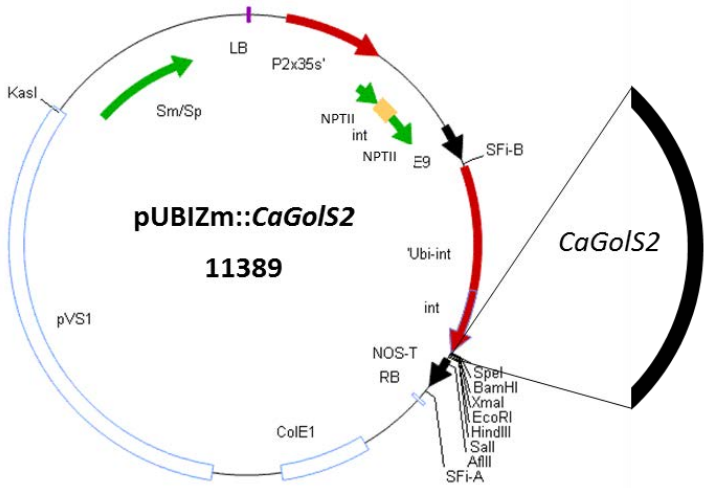
Figura 13: Etapas da cultura de tecidos de cana-de-açúcar. A) Explantes oriundos da região meristemática das variedades SP80-3280. B) Calos embriogênicos em meio MS modificado.



3.1.2 Construção do vetor para transformação genética

O gene *CaGolS2* codifica uma sintase de galactinol em cafeeiro (*C. arabica*). Este gene foi selecionado para transformação genética por ser responsivo aos estresses térmico, hídrico e salino (DOS SANTOS et al., 2011). A região codificante do *CaGolS2* foi amplificada por PCR utilizando *primers* específicos (CaGolS2_*SmaI* e CaGolS2_*SacI* – Tabela 4) e inserida em um vetor binário sob controle do promotor de poliubiquitina de milho (Ubi-Mz). Esse vetor foi adquirido da empresa DNA Cloning Service (Hamburg, Alemanha) e possui o gene de seleção *nptII*, que confere tolerância ao antibiótico geneticina, sob controle do promotor CaMV35S para seleção dos eventos transgênicos (Figura 14). O vetor contendo o a região codificante do *CaGolS2* (pUBI::GolS) foi inserido em *E. coli* cepa DH10b e uma alíquota foi separada para estocagem em cultura permanente (freezer -80ºC). Em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial (SAMBROOK et al., 1989) e a construção foi confirmada por digestão enzimática, utilizando os sítios *BamH*I e *Sal*I, e por sequenciamento Sanger.

Figura 14: Esquema do vetor de expressão utilizado para clonagem da região codificante de *CaGol2* sob controle do promotor UbiZm para transformação genética de cana-de-açúcar. O gene *npt*II, que confere resistência ao antibiótico geneticina, permite a seleção das plantas transgênicas e é controlado pelo promotor CaMV35S (P35S).



3.1.3 Transformação genética de cana-de-açúcar por biobalistica

Para a obtenção dos eventos de transformação, calos embriogênicos foram tratados em meio MSC1 (meio MS com menor concentração do hormônio 2,4-D - 1mg/mL) por sete dias, na ausência de luz. Após este período, os calos foram transferidos quatro horas antecedentes ao experimento de transformação para placas de Petri com meio osmótico (meio MS acrescido de 72,88 g/L de manitol e 72,88 g/L de sorbitol). A precipitação dos plasmídeos sobre as micropartículas de tungstênio (W18-Biorad®) seguiu a metodologia de Rech et al. (2008). Como controle negativo da transformação, foram utilizados calos embriogênicos mantidos em meio osmótico, porém submetidos ao bombardeamento das micropartículas precipitadas junto ao vetor vazio (sem o cds de *CaGolS2*).

O equipamento de bombardeamento utilizado foi o PDS-1000/He (Biorad®). A pressão de ruptura de disco utilizada foi de 1200 - 1400 psi e a distância percorrida pela micropartícula até atingir os calos foi 90 mm. Os eventos de transformação genética e multiplicação de plantas foram realizados em laboratório que possui Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB 059/98).

3.1.4 Seleção e confirmação molecular dos eventos transformados

Após o bombardeamento, os calos foram transferidos para meio MSC1 e mantidos por dez dias no escuro para aclimatação e recuperação do estresse ocorrido no processo invasivo de biobalística. Em seguida, os calos foram transferidos para meio seletivo, composto por MS modificado acrescido de 30 mg/L do antibiótico geneticina, porém na ausência de 2,4-D e mantidos sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro a 27°C. A cada 2-3 semanas, os calos transformados foram subcultivados até a formação de plântulas. Plântulas recém-transformadas que se desenvolveram em meio nutritivo acrescido do agente de seleção são consideradas eventos transgênicos putativos, os quais foram confirmados em análises subsequentes.

A Figura 15 resume o processo de transformação genética por biobalística de cana-de-açúcar utilizada neste trabalho.

Figura 15: Fluxograma da transformação genética via biobalística.

3.1.5 Transferência de plantas em ambiente de contenção

As plantas transgênicas confirmadas por meio de amplificação de PCR *primer*-específica foram transferidas para ambiente de contenção (casa-de-vegetação) para crescimento e desenvolvimento. Inicialmente, as plantas foram transplantadas copos plásticos de 700mL contendo substrato vegetal. Após atingirem 8 meses, foram

transferidas para vasos de 12L com solo do tipo basalto vermelho equilibrado e enriquecido de adubo NPK 10/10/10 e cultivadas para análises subsequentes.

3.1.6 Extração de RNA, síntese de cDNA e avaliação transcricional de *CaGolS2* nas plantas transgênicas de cana-de-açúcar.

O nível transcricional do transgene *CaGolS2* nos eventos transformados foi avaliado por reação de RT-PCR. A extração de RNA seguiu a metodologia de Korimbocus et al. (2002), a qual utiliza tampão CTAB na homogeneização das amostras e cloreto de lítio na precipitação do RNA. Foram utilizados 200mg de tecido foliar em nitrogênio líquido por extração. Das amostras de RNA total, o RNA mensageiro foi purificado por meio do kit de captura de mRNA Roche®, que dispensa o uso de DNase. A reação de síntese de cDNA foi feita com o kit ImProm^{TM} (PROMEGA®) e utilizou 600 ng de mRNA. O ciclo de PCR foi composto por um período de desnaturação inicial a 95ºC por 5 minutos, e por ciclos de: desnaturação (95ºC por 30 segundos), anelamento (63ºC por 45 segundos) e extensão (72ºC por 30 segundos). Para o transgene *CaGolS2,* foram utilizados 35 ciclos de reação e para o normalizador, 30 ciclos. O normalizador utilizado foi o gene 14-3-3 de cana-de-açúcar (Rocha et al. 2007). Os *primers* utilizados estão indicados na Tabela 4:

Tabela 4: *Primers* utilizados para a clonagem, confirmação da construção e avaliação transcricional semi-quatitativa.

Primer		
CaGolS2 *SmaI*	cccgggATGGGATCGATGGAAATGAAC	
CaGolS2 *SacI*	gagctcCATTAGGCAGCCGAGGGAG	
	Forward	*Reverse*
CaGolS2_check	CTTTCCAATAATCTCCACTTCC	GCTGATGCACCCTCCAAG
CaGolS2_F e _R	GAGGCTCCATTAGGCAGCCGAGGGAG	CCCGGGATGGGATCGATGGAAATGAAC
Sc14-3-3	GCATCCAGCCATCATTTATCG	GCTGCTGCCATTGCTGCTG

A imagem do gel de RT-PCR foi processada no software ImageJ (ABRAMOFF et al., 2004) o qual converte a intensidade da banda de amplificação do gel em valores numéricos. A partir disso, o cálculo da razão de amplificação seguiu a fórmula: iA/iN, onde iA é a intensidade de amplificação do gene alvo e iN, do normalizador.

3.1.7 Caracterização mofológica e fisiológica das plantas transgênicas

Na caracterização morfológica foram avaliados os seguintes parâmetros: número de perfilhos, número de folhas totalmente expandidas, altura do colmo (cm), número de internós, diâmetro de colmo, comprimento e largura da folha +3, e massa fresca do colmo. A área foliar foi calculada seguindo o cálculo proposto por Francis et al. (1969) por meio da fórmula: AF = C x L x (0,75), onde C é o comprimento e L a largura da folha +3.

A avaliação fisiológica dos eventos foi realizada em plantas de 9 meses com o analisador de gás por infravermelho Li-6400XTR (LiCor, EUA, sob irradiação de 1600 μmol m^{-2} s^{-1} e concentração de CO_2 de 400 ppm) e observou-se os parâmetros assimilação de CO2 (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO_2 (Ci) e transpiração (E). As aferições foram realizadas as 10:00 horas da manhã, a uma temperatura ambiente de 25 °C.

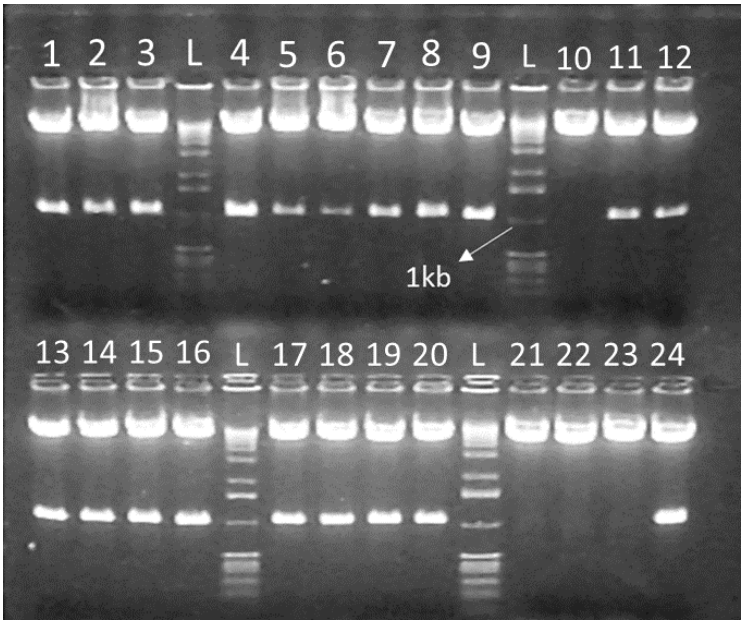
A análise estatística foi realizada utilizando o programa InfoStat versão 2015d (RIENZO et al., 2011). Foi aplicado o teste de Duncan, que informa se há diferença estatística entre as médias dos tratamentos (grupos TA, TNA e Controle – Tabela 5) a uma significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3.2 Resultados e Discussão

3.2.1 Inserção da região codificante do gene *CaGolS2* no vetor de transformação

Para confirmar a inserção do quadro aberto de leitura do gene *CaGolS2* no vetor pUBI::GolS2, foi hidrolisado o DNA plasmidial extraído de 24 clones com as enzimas *BamH*I e *Sal*I (Figura 16). Essa combinação de enzimas libera um fragmento com tamanho aproximado de 1 kb, presente na maioria dos clones avaliados (Figura 17).

Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, da digestão de clones contendo o plasmídeo pUBI::GolS2 com as enzima *BamH* I e *Sal* I, que libera fragmento esperado de 1kb. L, marcador de peso molecular 1000 pb (1 kb). Clones 2, 3 e 4 foram selecionados para confirmação por sequenciamento.

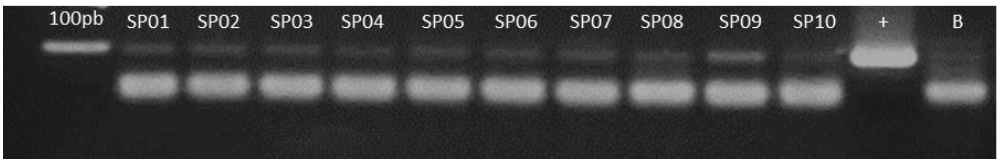


O DNA plasmidial das amostras 2, 3 e 4, que apresentaram o fragmento de tamanho compatível, foram enviados para sequenciamento Sanger (Macrogen). Após análise das sequências obtidas, foi possível concluir que o gene alvo foi inserido corretamente no vetor de expressão, sem mutações (dados não apresentados).

3.2.2 Regeneração, confirmação e multiplicação dos eventos transgênicos

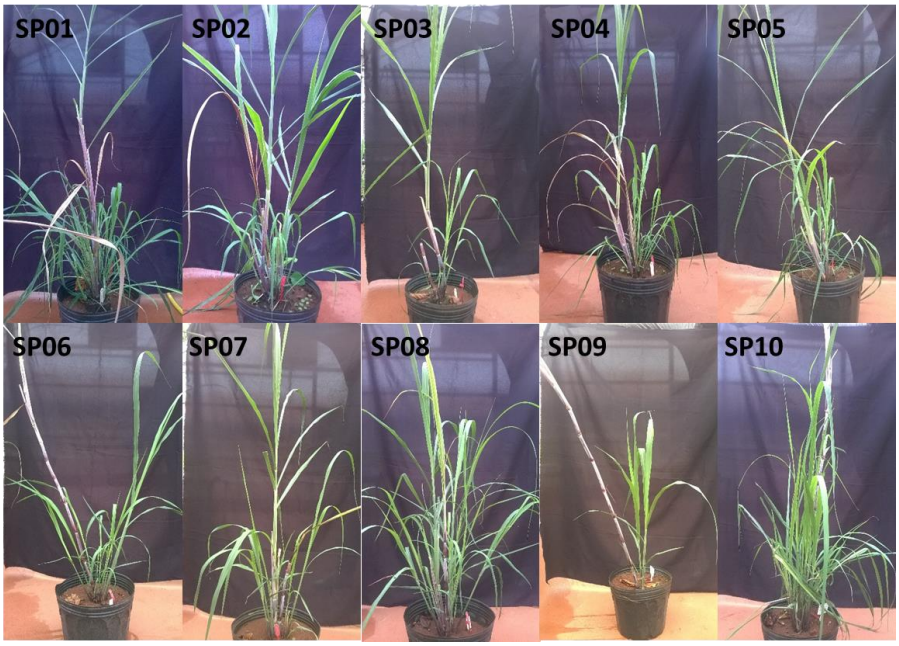
O protocolo de transformação genética utilizada foi eficiente na geração de eventos resistentes ao agente seletivo geneticina, produzindo 15 eventos independentes. A confirmação da inserção do gene alvo foi realizada por PCR (Figura 17) utilizando *primers* específicos para o gene galactinol sintase, que geram um fragmento de 100 pb (CaGolS2_F e CaGolS2_R – Tabela 4). No total, foram regeneradas 10 plantas da variedade SP 80-3280 que continham o transgene.

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, de reação de PCR das plantas de cana tolerantes a antibiótico regeneradas SP01 a SP10. Como controle positivo (+) foi utilizado o plasmídio de transformação UbiZm::*CaGolS2*, e como controles negativos: (C-), DNA de folha da variedade SP 90-3280 não transformada. (B), controle negativo da reação de PCR.



As plantas transgênicas de cana-de-açúcar foram aclimatadas e transferidas para casa de vegetação (Figura 18). Este material foi utilizado para avaliação transcricional do transgene, análises morfológicas e fisiológicas. No momento de execução dos experimentos, as plantas tinham 9 meses de idade.

Figura 18: Plantas da variedade SP80-3280 transformadas geneticamente com o gene galactinol sintase de *Coffea arabica* (*CaGolS2*) após transplante para vaso em casa de vegetação. SP01-SP08, 8 meses de idade; SP09 e SP10, 9 meses de idade.

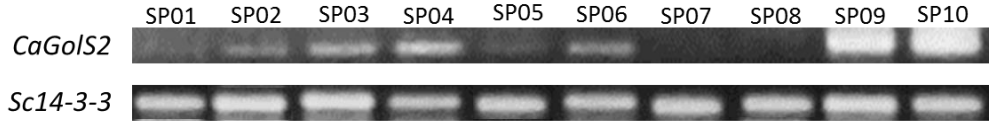


3.2.3 Avaliação transcricional do gene *CaGolS2* em cana-de-açúcar transgênica

Foi realizada reação de RT-PCR com o cDNA de plantas transgênicas utilizando-se *primers* específicos para o gene *CaGolS2*. Dos 10 eventos transgênicos

confirmados (Figura 19), seis (SP02, SP03, SP04, SP05, SP06, SP09 e SP10) tiveram a amplificação do transgene *CaGolS2*.

Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo de RT-PCR com cDNA das plantas confirmadas para transgenia de *CaGolS2* (SP01-SP10; superior da figura). A normalização da amplificação foi realizada com o gene *Sc14-3-3*.



A análise de RT-PCR mostra variação transcricional do transgene *CaGolS2* entre as plantas transgênicas (Figura 19). Os eventos SP09 e SP10 expressam o transgene em nível mais elevado que os demais e isso pode explicar a diferença morfo-fisiológica (Figura 20 e 21) dessas plantas em relação aos demais eventos.

O processamento da imagem da Figura 19 por meio do software Image J permitiu quantificar a expressão dos eventos transgênicos. Essa quantificação é feita por meio da razão de amplificação (Ramp), que mostra em números a expressão do gene alvo *CaGolS2* em relação ao normalizador *Sc14-3-3* (Anexo I). A razão entre a amplificação de *CaGolS2* e *Sc14-3-3* é colocada na Tabela 5.

Tabela 5: Conversão da intensidade luminosa da banda de RT-PCR na razão de amplificação. Legenda: TA, eventos transgênicos que expressam *CaGolS2;* TNA, eventos transgênicos que não expressam *CaGolS2;* Controle, plantas não transformadas da variedade SP80-3280.

Grupo	Evento	Razão
TA	SP02	0,46
	SP03	0,60
	SP04	0,97
	SP06	0,57
	SP09	0,76
	SP10	0,70
TNA	SP01	0,16
	SP05	0,19
	SP07	0,14
	SP08	0,02
Controle	Plantas SP80-3280 Não-transgênicas	

De acordo com a razão de amplificação, os eventos transgênicos foram organizados em dois grupos:

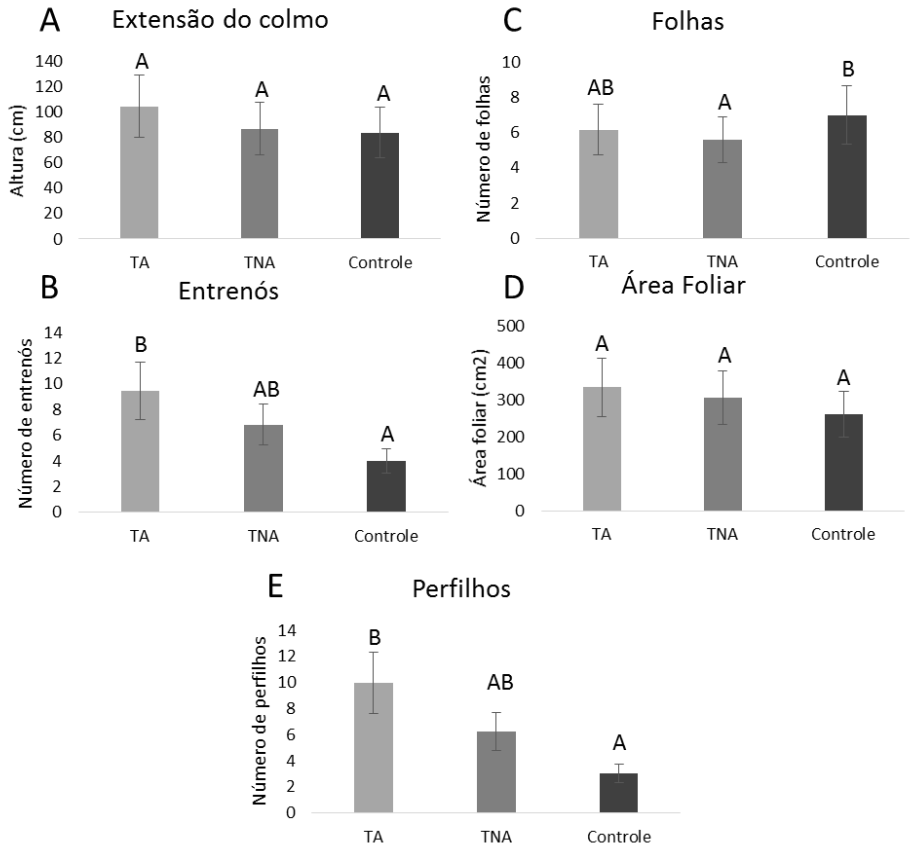
1) TA, no qual os eventos transgênicos tem Ramp acima de 0,4: SP02, SP03, SP04, SP06, SP09 e SP10;
2) TNA, no qual foram classificados os eventos com Ramp abaixo de 0,4: SP01, SP05, SP07 e SP08.

Estes dois grupos foram então comparados a plantas não-transformadas que passaram pelo processo de cultura de tecidos e aclimatação, denominado grupo Controle.

3.2.4 Caracterização morfológica e fisiológica das plantas transgênicas

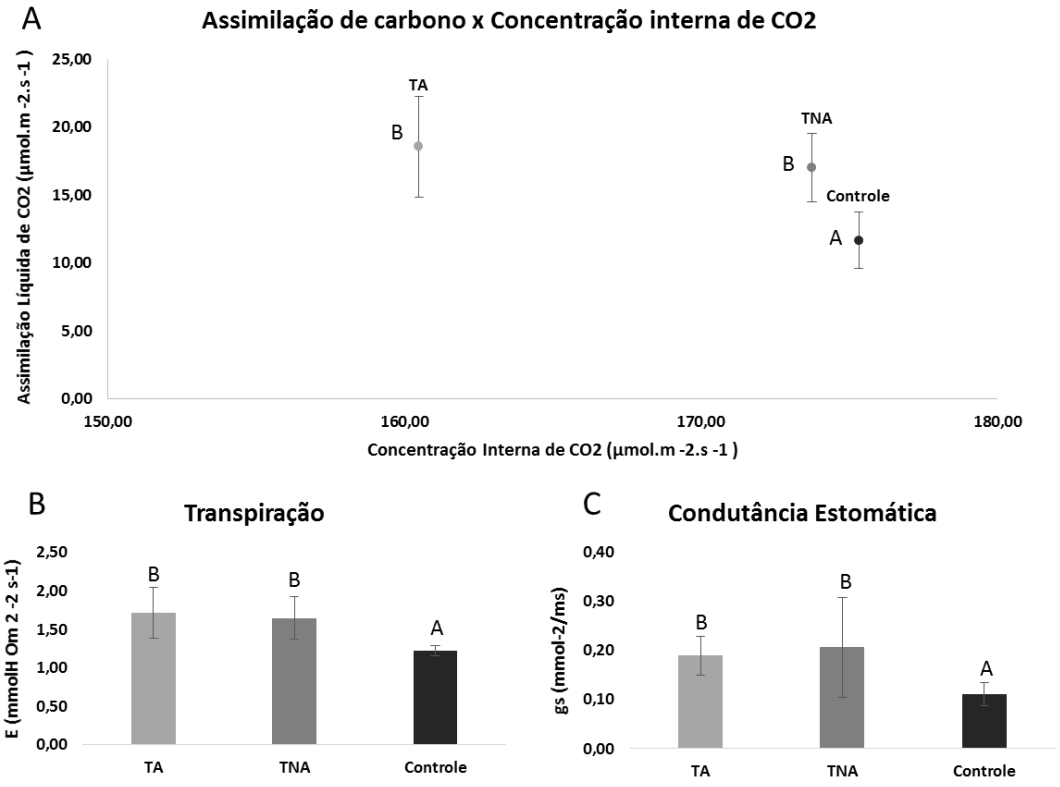
Na maioria dos parâmetros morfológicos avaliados, os eventos TA apresentem características que os diferenciam das plantas não transformadas (Figura 20) e também dos transgênicos TNA, os quais não expressam *CaGolS2*. Nos eventos TA foram observados uma maior altura do colmo (Figura 20A), maior número de entrenós por colmo (Figura 20B), maior número de folhas totalmente expandidas (Figura 20C), maior área foliar (Figura 20D), e maior perfilhamento a partir do colmo principal (Figura 20E). Todas essas características morfológicas são de interesse de seleção em plantas jovens, e podem indicar diferenças dessas plantas em relação as variedades não transgênicas. O perfilhamento da cultivar SP80-3280 é considerado baixo-médio (RIDESA, 2012), e a média dos eventos TA, principalmente o evento SP02 (14 perfilhos) foi maior que em plantas não-transformadas. Outro exemplo é o caso do evento transgênico SP09, que apresenta 217,74 g de massa fresca no colmo e 1,90 m de comprimento (dados não mostrados), enquanto que a planta não transformada da mesma idade soma 119,14 g e 80,5 cm.

Figura 20: Parâmetros morfológicos das plantas transgênicas de cana transformadas com *CaGolS2* e não transgênicas. A) extensão do colmo; B) número de entrenós; C) número de folhas totalmente expandidas; D) área foliar; E) número de perfilhos. Barras de cor cinza claro: plantas transgênicas que expressam o transgene *CaGolS2;* Cor cinza escuro: plantras transgênicas que não expressam o transgene *CaGolS2;* Cor preta: plantas não transgênicas. Letras maiúsculas mostram diferença estatística entre médias pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).



As plantas transgênicas do grupo TA são mais eficientes na assimilação de carbono, transpiração e condutância estomática que as não transformadas (Figura 21 A, B e C, respectivamente). Entre as TA, o evento SP10 foi o mais eficiente no metabolismo e uso de carbono, pois sua razão de assimilação líquida de CO_2 pela concentração interna de CO_2 é 62,5% maior que a média das plantas não transformadas (dados não mostrados).

Figura 21: Parâmetros fotossintéticos das plantas transgênicas de cana transformadas com *CaGolS2*. A) razão entre assimilação líquida de CO2 pela concentração interna de CO2; B) transpiração; C) condutância estomática. Barras e pontos de cor cinza claro: plantas TA - transgênicas que expressam o transgene *CaGolS2;* Cor cinza escuro: plantas transgênicas que não expressam o transgene *CaGolS2* - TNA*;* Cor preta: plantas não transgênicas - Controle. Letras maiúsculas mostram diferença estatística entre médias pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$).



Os eventos SP06, SP09 e SP10, que apresentam uma maior expressão do transgene são eventos candidatos para avaliação de tolerância a estresses. Uma das hipóteses que pretendemos testar é se estes eventos são mais tolerantes ao estresse hídrico, térmico e oxidativo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados apresentados, concluímos que os genes RFOs em cana são diferencialmente expressos em estresse hídrico. O gene *ScGolS1* mostra resposta transcricional genótipo-específico e atua prontamente ao estresse hídrico em folhas e de responde acordo com o aumento da severidade do estresse em colmo. *ScRFS1* e *ScSTS1* são responsivos ao estresse hídrico, tanto em folha como em colmo. Como observado nos padrões transcricionais de galactinol e estaquiose sintase, estes genes parecem desempenhar uma importante função no carregamento do floema pelo mecanismo de captura de polímeros e também no ajuste osmótico para maior absorção de água e nutrientes quando a cana está em déficit hídrico. Além disso, a análise filogenética mostrou que os genes galactinol sintase apresentam padrões evolutivos distintos dos genes rafinose e estaquiose sintase.

Os eventos transgênicos mostraram características promissoras. As plantas com nível trascricional de *CaGolS2* mais elevado também apresentaram maior taxa de assimilação de CO_2 e transpiração que as plantas não transformadas. Adicionalmente, as estruturas morfológicas dos eventos transgênicos se destacam em comparação com plantas não transgênicas, pois contém características de interesse para a seleção de plantas jovens para o estudo de uma nova variedade transgênica de cana-de-açúcar. Os eventos transgênicos SP06, SP09 e SP10 possuem características morfológicas e fisiológicas de diferença mais marcante em relação a plantas não-transformadas, e dessa forma, candidatos para avaliações moleculares mais aprofundadas.

5 REFERÊNCIAS

ABAEI-AGHDAEI, S.R.; PEARCE, R.S.; HARRISON, P. Sugars regulate coldinduced gene expression and freezing tolerance in barley cell cultures. **Journal of Experimental Botany**. 54:1565-1575, 2003.

ABRÀMOFF, Michael D.; MAGALHÃES, Paulo J.; RAM, Sunanda J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics international**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.

AGEINTEC (Agência Embrapa de Informação Tecnológica). Disponível em: **http:// http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/**. Acesso em: abril 2015.

AHUJA, Ishita et al. Plant molecular stress responses face climate change.**Trends in plant science**, v. 15, n. 12, p. 664-674, 2010.

AKHTAR, S.; WAHID, A.; RASUL, E. Emergence, growth and nutrient composition of sugarcane sprouts under NaCl salinity. **Biologia plantarum**, v. 46, n. 1, p. 113-116, 2003.

ANJUM, Shakeel Ahmad et al. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 9, p. 2026-2032, 2011.

AMIARD, Véronique et al. Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in perennial ryegrass.**Plant physiology**, v. 132, n. 4, p. 2218-2229, 2003.

ARENCIBIA, Ariel et al. Production of transgenic sugarcane (Saccharum officinarum L.) plants by intact cell electroporation. **Plant Cell Reports**, v. 14, n. 5, p. 305-309, 1995.

ARRUDA, Paulo. Perspective of the sugarcane industry in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 3-8, 2011.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007.

ASHRAF, M. Inducing drought tolerance in plants: recent advances.**Biotechnology advances**, v. 28, n. 1, p. 169-183, 2010.

AYRE, Brian G. Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning. **Molecular plant**, v. 4, n. 3, p. 377-394, 2011.

BACHMANN, Markus; MATILE, Philippe; KELLER, Felix. Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of Ajuga reptans L.(cold acclimation, translocation, and sink to source transition: discovery of chain elongation enzyme). **Plant physiology**, v. 105, n. 4, p. 1335-1345, 1994.

BAILEY-SERRES, Julia et al. Making sense of low oxygen sensing. **Trends in plant science**, v. 17, n. 3, p. 129-138, 2012.

BAKKER, Henk. **Sugarcane cultivation and management**. Springer, 1999.

BARBA, R.; NICKELL, L. G. Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugarcane, a monocotyledon. **Planta**, v. 89, n. 3, p. 299-302, 1969.

BARTELS, Dorothea; SUNKAR, Ramanjulu. Drought and salt tolerance in plants. **Critical reviews in plant sciences**, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.

BELINTANI, N. G. et al. Improving low-temperature tolerance in sugarcane by expressing the ipt gene under a cold inducible promoter. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 1, p. 71-77, 2012.

BHATNAGAR-MATHUR, Pooja; VADEZ, V.; SHARMA, Kiran K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects.**Plant cell reports**, v. 27, n. 3, p. 411-424, 2008.

BOWER, Robert; BIRCH, Robert G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, v. 2, n. 3, p. 409-416, 1992.

BRAUN, David M.; SLEWINSKI, Thomas L. Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. **Plant Physiology**, v. 149, n. 1, p. 71-81, 2009.

BRAY, Elizabeth A. Molecular responses to water deficit. **Plant physiology**, v. 103, n. 4, p. 1035, 1993.

CARVALHO, S. J. P; MOREIRA, M. S; NICOLAI, M.; OVEJERO, R. F. L; CHRISTOFFOLETI, P. J; MEDEIROS, D. – Crescimento e Desenvolvimento da planta Daninha Capim Camelote. **BRAGANTIA**, v.64, p.591-600, 2005.

CHANDEL, Anuj K. et al. Use of Saccharum spontaneum (wild sugarcane) as biomaterial for cell immobilization and modulated ethanol production by thermotolerant Saccharomyces cerevisiae VS 3. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p. 2404-2410, 2009.

CHANDEL, Anuj K. et al. Use of Saccharum spontaneum (wild sugarcane) as biomaterial for cell immobilization and modulated ethanol production by thermotolerant Saccharomyces cerevisiae VS 3. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p. 2404-2410, 2009.

CHAVES, M. M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of experimental Botany**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 1991.

CHAVES, Manuela M.; MAROCO, João P.; PEREIRA, João S. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant.**Functional plant biology**, v. 30, n. 3, p. 239-264, 2003.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, Adriana et al. Sugarcane (Saccharum X officinarum): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, v. 4, n. 1, p. 62-89, 2011.

CHEN, W. H. et al. Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimaeric gene. **Plant Cell Reports**, v. 6, n. 4, p. 297-301, 1987.

CONAB (Campanha Nacional de Abastecimento). Disponível em: **http://www.conab.gov.br**. Acesso em: abril. 2015.

CUADRADO, A. Genome remodeling in three modern S. officinarum and S. spontaneum sugarcane cultivars. **Journal of Experimental Botany.:** 55, 847–854, 2004.

DE SETTA, Nathalia et al. Noise or Symphony: Comparative Evolutionary Analysis of Sugarcane Transposable Elements with Other Grasses. In: **Plant Transposable Elements**. Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 169-192.

D'HONT, Angelique et al. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (Saccharum spp.) by molecular cytogenetics.**Molecular and General Genetics MGG**, v. 250, n. 4, p. 405-413, 1996.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, Y. C. (2011). InfoStat versión 2011. *Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www. infostat. com. ar*.

DIERKING, Emily C.; BILYEU, Kristin D. Association of a soybean raffinose synthase gene with low raffinose and stachyose seed phenotype. **The Plant Genome**, v. 1, n. 2, p. 135-145, 2008.

DOS SANTOS, Claudiana Moura; DE ALMEIDA SILVA, Marcelo. Physiological and biochemical responses of sugarcane to oxidative stress induced by water deficit and paraquat. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 8, p. 1-14, 2015.

DOS SANTOS, Tiago B. et al. Expression of three galactinol synthase isoforms in Coffea arabica L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 441-448, 2011.

DOWNIE, Bruce et al. Expression of a GALACTINOL SYNTHASE gene in tomato seeds is up-regulated before maturation desiccation and again after imbibition whenever radicle protrusion is prevented. **Plant Physiology**, v. 131, n. 3, p. 1347-1359, 2003.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

EGERT, Aurélie; KELLER, Felix; PETERS, Shaun. Abiotic stress-induced accumulation of raffinose in Arabidopsis leaves is mediated by a single raffinose synthase (RS5, At5g40390). **BMC plant biology**, v. 13, n. 1, p. 218, 2013.

ELSAYED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. **Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2014.

FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação). Disponível em: **http://www.fao.org.br**. Acesso em: mar. 2013.

FLEXAS, Jaume et al. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations.**Functional Plant Biology**, v. 29, n. 4, p. 461-471, 2002.

GASCHO, G.J.; SHIN, S.F. Sugarcane. In: TEARE, I.D.; PEET, M.M. (Ed.). **Crop-Water relations**. New York: John Wiley, p.445-479, 1983.

GIL, Lidor et al. Sucrose transporter plays a role in phloem loading in CMV-infected melon plants that are defined as symplastic loaders. **The Plant Journal**, v. 66, n. 2, p. 366-374, 2011.

GILBERT, Glena A.; WILSON, Clyde; MADORE, Monica A. Root-zone salinity alters raffinose oligosaccharide metabolism and transport in Coleus. **Plant Physiology**, v. 115, n. 3, p. 1267-1276, 1997.

GILL, Sarvajeet Singh; TUTEJA, Narendra. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GRAÇA, José Perez da et al. Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 3, p. 189-197, 2010.

GUERZONI, Julia Tufino Silva et al. Stress-induced Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene confers tolerance to salt stress in transgenic sugarcane. **Physiologia Plantarum**, v. 36, n. 9, p. 2309-2319, 2014.

HARB, Amal et al. Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1254-1271, 2010.

HARE P. D., CRESS W. A., VAN STADEN J. Dissecting the roles of Osmolyte accumulation during stress. **Plant Cell Environmen**: 21. 535-554, 1998.

HEINZ D. J., MEE G. W. P. Plant differentiation from callus tissue of Saccharum species. **Crop Science:** 9, 346–348, 1969.

HIMURO, Yasuyo et al. Arabidopsis galactinol synthase AtGolS2 improves drought tolerance in the monocot model Brachypodium distachyon. **Journal of plant physiology**, v. 171, n. 13, p. 1127-1131, 2014.

HINCHA, Dirk K.; ZUTHER, Ellen; HEYER, Arnd G. Effects on fusion and lipid phase transitions mediate the preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1612, n. 2, p. 172-177, 2003.

HOGARTH, D. M. Genetics of sugarcane. In: D. J. HEINZ (ed), **Sugarcane Improvement Through Breeding:** 255 - 272, 1987.

HOLTHAUS, Uta; SCHMITZ, Klaus. Distribution and immunolocalization of stachyose synthase in Cucumis melo L. **Planta**, v. 185, n. 4, p. 479-486, 1991.

HORBOWICZ, Marcin; OBENDORF, Ralph L. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols—review and survey. **Seed Science Research**, v. 4, n. 04, p. 385-405, 1994

HOTTA, Carlos T. et al. The biotechnology roadmap for sugarcane improvement. **Tropical Plant Biology**, v. 3, n. 2, p. 75-87, 2010.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field crops research**, v. 92, n. 2, p. 185-202, 2005.

INZE. Â D, VAN MONTAGU M. 1995. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology** 6, 153-158.

JAIN, Radha et al. Low temperature stress-induced biochemical changes affect stubble bud sprouting in sugarcane (Saccharum spp. hybrid). **Plant Growth Regulation**, v. 53, n. 1, p. 17-23, 2007.

JAIN, Radha et al. Nutrient application improves stubble bud sprouting under low temperature conditions in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 11, n. 1, p. 83-85, 2009.

JIFON, John et al. Differential morphological, physiological, and molecular responses to water deficit stress in sugarcane. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 7, n. 7, p. 225-231, 2015.

KARIM, Sazzad et al. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. **Plant molecular biology**, v. 64, n. 4, p. 371-386, 2007.

KASUGA M., LIU Q., MIURA S., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology:** 17, 287–291, 1999.

LAKSHMANAN, Prakash et al. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 4, p. 345-363, 2005.

LANGMEAD, Ben; SALZBERG, Steven L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, v. 9, n. 4, p. 357-359, 2012.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 275-294, 2002.

LAWLOR, David W.; TEZARA, Wilmer. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany**, 2009.

LAWLOR, David W.; TEZARA, Wilmer. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany**, 2009.

LEHLE, Ludwig; TANNER, Widmar. The Function of myo-Inositol in the Biosynthesis of Raffinose. **European Journal of Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 103-110, 1973.

LI, Suhong et al. Characterization of raffinose synthase from rice (Oryza sativa L. var. Nipponbare). **Biotechnology letters**, v. 29, n. 4, p. 635-640, 2007.

LI, Xu et al. Expression of a *GALACTINOL SYNTHASE* gene is positively associated with desiccation tolerance of *Brassica napus* seeds during development. **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 15, p. 1761-1770, 2011.

LINGLE S. E., WIEGAND C. L. Soil salinity and sugarcane juice quality. **Crops Research**: 54, 259-268, 1997.

MAHAJAN, Shilpi; TUTEJA, Narendra. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139-158, 2005.
MARTIN, J. P. The anatomy of the sugar cane plant. **Sugarcane Diseases of the World. Elsevier Amsterdam**, v. 1, p. 3-52, 1961.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. **BORÉM, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV**, p. 225-274, 2005.

MCCASKILL, Ashlee; TURGEON, Robert. Phloem loading in Verbascum phoeniceum L. depends on the synthesis of raffinose-family oligosaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 49, p. 19619-19624, 2007.

MITTLER, Ron. Abiotic stress, the field environment and stress combination.**Trends in plant science**, v. 11, n. 1, p. 15-19, 2006.

MOLINARI, H. B. C. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (Saccharum spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 2, p. 218-229, 2007.

MUDGE S. R., ROSANNE E. K. O., BONNETT G. D., MANNERS J. M., BIRCH R. G. Eficient silencing of reporter transgenes coupled to known functional promoters in sugarcane, a highly polyploid crop species. **Planta:** 229, 549–558, 2009.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAIDU, B.P. Production of betaine from Australian Melaleuca spp. for use in agriculture to reduce plant stress. **Australian Journal of Experimental Agriculture:** 43, 1163-1170, 2003.

NAIDU, K. M. e SREENIVASAN, T. V (1987). Conservation of the Sugarcane Germplasm. In: **Corpersucar International Sugarcane Breeding Workshop**. Copersucar, São Paulo, 33-53.

NAKASHIMA, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. ABA signaling in stress-response and seed development. **Plant cell reports**, v. 32, n. 7, p. 959-970, 2013.

NISHIYAMA JR, Milton Yutaka et al. Full-Length Enriched cDNA Libraries and ORFeome Analysis of Sugarcane Hybrid and Ancestor Genotypes. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107351, 2014

NISHIZAWA, Ayako; YABUTA, Yukinori; SHIGEOKA, Shigeru. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant physiology**, v. 147, n. 3, p. 1251-1263, 2008.

OBENDORF, Ralph L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. **Seed Science Research**, v. 7, n. 02, p. 63-74, 1997.

PAPINI-TERZI, F. S. et al. The SUCEST-FUN Project: identifying genes that regulate sucrose content in sugarcane plants. In: **Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists**. 2007.

PARVANOVA, Daniela et al. Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 57-63, 2004.

PÉREZ-LÓPEZ, Usue et al. The oxidative stress caused by salinity in two barley cultivars is mitigated by elevated CO2. **Physiologia Plantarum**, v. 135, n. 1, p. 29-42, 2009.

PESHEV, Darin et al. Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 4, p. 1025-1038, 2013.

PETERBAUER, Thomas et al. Functional expression of a cDNA encoding pea (Pisum sativum L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthesis. **Planta**, v. 215, n. 5, p. 839-846, 2002.

PRABA, M. Lakshmi et al. Identification of physiological traits underlying cultivar differences in drought tolerance in rice and wheat. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 195, n. 1, p. 30-46, 2009.

QIU, Zenghui; AITA, Giovanna M. Pretreatment of energy cane bagasse with recycled ionic liquid for enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 129, p. 532-537, 2013.

RAI, Mayank; HE, Chengkun; WU, Ray. Comparative functional analysis of three abiotic stress-inducible promoters in transgenic rice. **Transgenic research**, v. 18, n. 5, p. 787-799, 2009.

RATHORE, Keerti S.; CHOWDHURY, Vijay K.; HODGES, Thomas K. Use of bar as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts. **Plant molecular biology**, v. 21, n. 5, p. 871-884, 1993.

RICAUD, C. et al. (Ed.). **Diseases of sugarcane: major diseases**. Elsevier, 2012.

RICAUD, C.; RYAN, C. C. Leaf scald in '**Diseases of Sugarcane: Major Diseases'**(Eds C Ricaud, CBT Egan, BAG Gillaspie Jr, CG Hughes) pp. 39–53. 1989.

RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético). Disponível em: **http://www.ridesa.agro.ufg.br/**. Acesso em: abril 2015

ROBINSON-BEERS, Kay; EVERT, Ray F. Ultrastructure of and plasmodesmatal frequency in mature leaves of sugarcane. **Planta**, v. 184, n. 3, p. 291-306, 1991.

ROZEFF, N. Sugarcane and salinity-a review paper. **Sugar Cane. 5.**, 1995

SALES, Cristina RG et al. Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 326-336, 2013.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. Anatomia e botânica. **Cana-deaçúcar. Instituto Agronomico de Campinas, Campinas**, v. 882, 2008.

SCHNEIDER, Thomas; KELLER, Felix. Raffinose in chloroplasts is synthesized in the cytosol and transported across the chloroplast envelope. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 12, p. 2174-2182, 2009.

SEKI, Motoaki et al. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 194-199, 2003.

SENGUPTA, Sonali et al. Inositol methyl tranferase from a halophytic wild rice, Porteresia coarctata Roxb. (Tateoka): regulation of pinitol synthesis under abiotic stress. **Plant, cell & environment**, v. 31, n. 10, p. 1442-1459, 2008.

SENGUPTA, Sonali et al. Galactinol synthase across evolutionary diverse taxa: Functional preference for higher plants? **FEBS letters**, v. 586, n. 10, p. 1488-1496, 2012.

SENGUPTA, Sonali et al. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. **Frontiers in plant science**, v. 6, 2015.

SHAO, Hong-Bo et al. Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants-biotechnologically and sustainably improving agriculture

and the ecoenvironment in arid regions of the globe.**Critical reviews in biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 131-151, 2009.

SILVA, F. de A. S. e AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components in Analisys in the Software Assistat-Statistical Attendance. World Congress n Computers in Agriculture, 7. **American Society of Agricultural and Biological Enfineers**, 2009.

SOLOVYEV, V. Statistical approaches in eukaryotic gene prediction. **Handbook of statistical genetics**, 2007.

SREENIVASAN, T. V.; JALAJA, N. C. Sugarcane varietal improvement through tissue culture. In: **Plant Cell Culture in Crop Improvement**. Springer US, 1983. p. 371-376.

STOYANOVA, Silviya et al. The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 62, n. 3, p. 207-214, 2011.

SUI, Xiao-lei et al. Molecular cloning, characteristics and low temperature response of raffinose synthase gene in Cucumis sativus L. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 18, p. 1883-1891, 2012.

SUN, Zhibin et al. Overexpression of TsGOLS2, a galactinol synthase, in Arabidopsis thaliana enhances tolerance to high salinity and osmotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 69, p. 82-89, 2013.

TAHIR, Mohammad et al. An Assessment of Raffinose Family Oligosaccharides and Sucrose Concentration in Genus. **Crop Science**, v. 52, n. 4, p. 1713-1720, 2012.

TAIZ L., ZEIGER E. **Fisiologia vegetal.** Porto Alegre: Artmed, 2009. p.449-484.

THOLE, Julie M.; NIELSEN, Erik. Phosphoinositides in plants: novel functions in membrane trafficking. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 6, p. 620-631, 2008.
TURGEON, Robert. Phloem loading: how leaves gain their independence.**Bioscience**, v. 56, n. 1, p. 15-24, 2006.

TURGEON, Robert; AYRE, Brian G. Pathways and mechanisms of phloem loading. **Vascular transport in plants**, p. 45-67, 2005.

TURGEON, Robert; MEDVILLE, Richard; NIXON, Kevin C. The evolution of minor vein phloem and phloem loading. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 8, p. 1331-1339, 2001.

TURGEON, Robert; WEBB, J. A. Leaf development and phloem transport in Cucurbita pepo: carbon economy. **Planta**, v. 123, n. 1, p. 53-62, 1975.

UNDA, Faride et al. Isolation and characterization of galactinol synthases from hybrid poplar. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 5, p. 2059-2069, 2012.

VARGAS, Lívia et al. Drought Tolerance Conferred to Sugarcane by Association with Gluconacetobacter diazotrophicus: A Transcriptomic View of Hormone Pathways. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e114744, 2014.

VETTORE, André L. et al. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome research**, v. 13, n. 12, p. 2725-2735, 2003.

WANG, D. Molecular characterization and expression of three galactinol synthase genes that confer stress tolerance in *Salvia miltiorrhiza*. **Journal of plant physiology**, 2012.

WANG, Wangxia; VINOCUR, Basia; ALTMAN, Arie. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, n. 1, p. 1-14, 2003.

WEBB, J. A.; GORHAM, P. R. Translocation of photosynthetically assimilated C14 in straight-necked squash. **Plant physiology**, v. 39, n. 4, p. 663, 1964.

WEBSTER, ROBERT D.; SHAW, ROBERT B. Taxonomy of the native north American species of Saccharum (Poaceae: Andropogoneae). **SIDA, Contributions to Botany**, p. 551-580, 1995.

XUE, Hongwei; CHEN, Xu; LI, Gang. Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects. **Current opinion in plant biology**, v. 10, n. 5, p. 483-489, 2007.

YADAV, Umesh P.; AYRE, Brian G.; BUSH, Daniel R. Transgenic approaches to altering carbon and nitrogen partitioning in whole plants: assessing the potential to improve crop yields and nutritional quality.**Frontiers in plant science**, v. 6, 2015.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko; SHINOZAKI, Kazuo. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. **Trends in plant science**, v. 10, n. 2, p. 88-94, 2005.

YIN, Y. B. et al. Glycosyltransferases of the GT8 family. **Annual Plant Reviews. Plant Polysaccharides, Biosynthesis and Bioengineering**, v. 41, p. 167-211, 2011.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. **Photosynthetica**, v. 38, n. 2, p. 171-186, 2000.

ZHANG S. Z. Expression of the Grifola frondosa trehalose synthase gene and improvement of drought-tolerance in sugarcane (Saccharum officinarum L.). J. **Integr. Plant Biol**. 48, 453–459, 2006.

ZHANG, Shu-Zhen et al. Expression of the Grifola frondosa Trehalose Synthase Gene and Improvement of Drought-Tolerance in Sugarcane (Saccharum officinarum L.). **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, n. 4, p. 453-459, 2006.

ZHAO, Tian-Yong et al. Expression of the maize GALACTINOL SYNTHASE gene family: (I) Expression of two different genes during seed development and germination. **Physiologia Plantarum**, v. 121, n. 4, p. 634-646, 2004.

ZHOU, Jie et al. Responses of Populus trichocarpa galactinol synthase genes to abiotic stresses. **Journal of plant research**, v. 127, n. 2, p. 347-358, 2014.

ZHOU, Mei-Liang et al. Genome-wide identification of genes involved in raffinose metabolism in Maize. **Glycobiology**, v. 22, n. 12, p. 1775-1785, 2012.

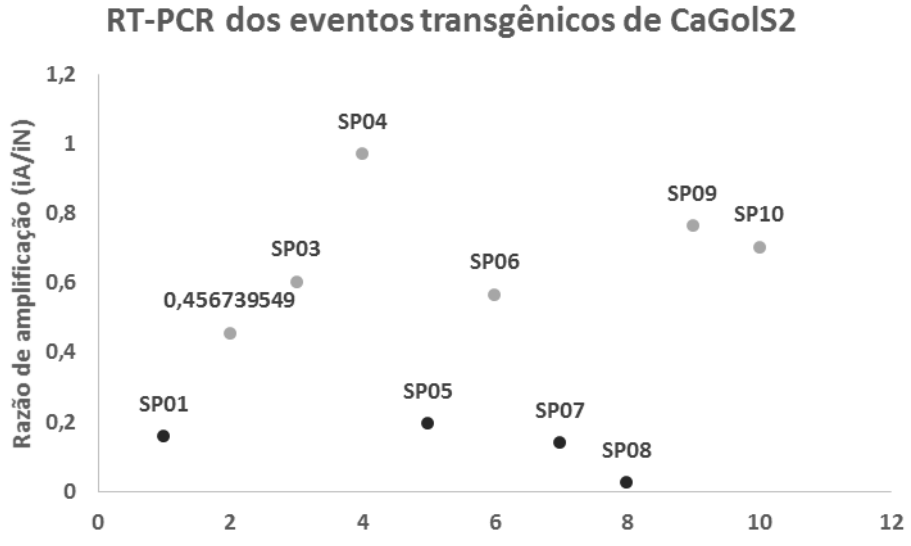
ZHOU, Tao; ZHANG, Rui; GUO, Sandui. Molecular cloning and characterization of GhGolS1, a novel gene encoding galactinol synthase from cotton (Gossypium hirsutum). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, n. 3, p. 699-709, 2012.

ZHUO, Chunliu et al. A cold responsive galactinol synthase gene from Medicago falcata (MfGolS1) is induced by myo-inositol and confers multiple tolerances to abiotic stresses. **Physiologia plantarum**, v. 149, n. 1, p. 67-78, 2013.

ZUTHER, Ellen et al. The role of raffinose in the cold acclimation response of Arabidopsis thaliana. **FEBS letters**, v. 576, n. 1, p. 169-173, 2004.

6 ANEXOS

Anexo I – Plotagem em dispersão da razão de amplificação



Anexo II - Sequência do gene de Galactinol Sntase em cana-de-açúcar

>*ScGolS1*_Sequência Codificante

ATGGCTCCCGAGCTGGCCGGCAAGATGACCGCCAAGGCCGCCGCCGCGGCGGTGAAGCCCG
CGACGAGGGCGTACGTGACGTTCCTGGCGGGCGACGGGGACTACTGGAAGGGCGTGGTGGG
CCTGGCCAAGGGCCTGCGCAAGGTCCGCTCGGCCTACCCGCTGGTGGTGGCCGTGCTGCCCG
ACGTGCCGGAGTCCCACCGCCGCATCCTCATCTCGCAGGGGTGCATCGTCCGCGAGATCGAG
CCCGTGTACCCGCCTGAGAACCAGACGCAGTTCGCCATGGCCTACTACGTCATCAACTATTC
CAAGCTCCGCATCTGGGAGTTCGTGGAGTACGAGAGGATGGTGTACCTGGACGCGGACATC
CAGGTGTTCGAGAACATCGACGAGCTGTTCGAGCTCGAGAAGGGCTACTTCTACGCGGTGAT
GGACTGCTTCTGCGAGAAGACGTGGAGCCACACGCCGCAGTACAAGATCGGCTACTGCCAG
CAGTGCCCGGACAAGGTGGCGTGGCCAACCGCCGAGCTGGGCCCTCCGCCGGCGCTCTACTT
CAACGCCGGCATGTTCGTGCACGAGCCCAGCATGGCCACCGCCAAGGCACTCCTCGACACCC
TCCGCGTGACTCCGCCCACCCCCTTCGCAGAGCAGGACTTCCTGAACATGTTCTTCAGGGAC
CAGTACAGGCCGATCCCGAACGTGTACAACCTCGTGCTCGCCATGCTCTGGAGGCACCCCGA
GAACGTGCAGCTGGAGAAGGTGAAGGCCGTGCACTACTGCGCGGCGGGGTCGAAGCCCTGG
AGGTTCACGGGCAAGGAGGCCAACATGGACAGGGAGGACATCAAGATGCTGGTGAAGAAG
TGGTGGGACATCTACAACGACGAGACGCTGGACTTCAAGGGCCTGCCCCTCTCGCCCGCCGA
CGCCGACGACGAGGTGGAGGCGGTGGCCAAGAAGCCGCTCCGCGCCGCGCTGGCGGAGGCC
GGCACGGTCAAGTACGTCACGGCGCCCTCGGCCGCCTGA

>*ScGolS1_* Proteína

MAPELAGKMTAKAAAAAVKPATRAYVTFLAGDGDYWKGVVGLAKGLRKVRSAYPLVVAVLP
DVPESHRRILISQGCIVREIEPVYPPENQTQFAMAYYVINYSKLRIWEFVEYERMVYLDADIQVFE
NIDELFELEKGYFYAVMDCFCEKTWSHTPQYKIGYCQQCPDKVAWPTAELGPPPALYFNAGMF
VHEPSMATAKALLDTLRVTPPTPFAEQDFLNMFFRDQYRPIPNVYNLVLAMLWRHPENVQLEK
VKAVHYCAAGSKPWRFTGKEANMDREDIKMLVKKWWDIYNDETLDFKGLPLSPADADDEVEA
VAKKPLRAALAEAGTVKYVTAPSAA

Anexo III - Sequências dos genes de Rafinose Sntase em cana-de-açúcar

>*ScRFS1_* Sequência Codificante

ATGACGGTGGGCGCCGGGATCGCCGTCCAGGACGGCAGCCTCCTGGCGCTGGGTGCCGAGG
TCCTGCGGGAGGTGCGCCCCAACGTGCTCGTCACGCCCGCCGCCGGCGGAGGCCTCACCAAC
GGCGCGTTCCTCGGCGTCCGCTCCGCACCCGCCGGCAGCCGCAGCGTCTTCCCCGTCGGGAA
GCTCCGGGACCAGCGGTTCATGTGCACGTTCCGGTTCAAGATGTGGTGGATGACGCAGAGG
ATGGGCTCATCAGGCCGCGACATCCCCTTCGAGACGCAGTTCCTGATCGTTGAAGGCACTGA
TGGACTGCAGTCCACCGGCGAGCAGCCTGTCGTGTACACCGTCTTCCTCCCAATACTGGAGG
GCTCGTTCCGTGCTGTTCTTCAGGGGAACGCTGACGATGAGCTGGAGATTTGCTTAGAGAGT
GGCGATCCAGATGTGGAATCCTTCGAAGGCTCCCATCTGGTCTTTGTTGGCGCCGGATCGGA
TCCGTTCGATGTCATCACAAATTCAGTAAAAGTCGTTGAGAGGCACTTGCAGACGTTTTCTC
ACAGGGAAAAGAAAAAGAGTTCTGAATCTTTCAACTTGCCGCAGATGCCAGACATGCTGAA

CTGGTTTGGTTGGTGCACGTGGGATGCGTTCTACACCAATGTCACTGCTCAAGGAGTGAAGG
AAGGATTACAGAGCTTTGAGAAAGGTGGGGTTTCTCCTAGATTTGTCATAATTGACGACGGA
TGGCAGTCGGTCGCTATGGATCCTGTGGGAATCGCGTGCTTATCTGATAACTCAGCCAACTT
TGCAAACAGGTTAACTCACATCAAGGAGAACCACAAGTTTCAGAAAAATGGCAGGGAGGGT
CACAGGGAAGATGATCCAGCAAAGGGCCTAGCACACATCGTCAATGAAATCAAAGGGAAAC
ATGAGCTGAAGTACGTGTATGTATGGCATGCCATTACCGGATACTGGGGTGGAGTCAGGCCA
GGTGTAGTTGGAATGGAGCACTACGAATCAAAGATGCAGCAGCCTGTGTCATCACCAGGGG
TTCAGAAAAACGAGCCCTGTGATGCTTTGGACAGCATAACGACCAATGGAATGGGCCTTGTG
AACCCTGAGAGAGTATTCAGTTTCTACAATGAACTCCACTCGTATCTTGCTTCTGCTGGGATC
GACGGGGTCAAGGTAGACGTGCAGAACATCCTTGAGACGCTAGGTGCTGGCCATGGGGGAA
GGGTACTGCTGGCTAGAAAGTACCAGCAGGCTCTAGAAGCTTCTGTCGCTAGGAACTTCCCT
GACAATGGCATCATATCATGCATGAGCCACAATACAGACAACTTATACAGTTCAAAAAGGA
GCGCGGTGATTAGAGCCTCTGATGATTTCTGGCCGAGAGACCCTGCTTCCCATACCATACAC
ATTGCATCTGTCGCGTATAACACAGTCTTTCTTGGAGAATTCATGCAGCCAGATTGGGACAT
GTTCCATAGTGTTCATCCGATGGCTGAATACCATGCTGCAGCTCGAGCAGTTGGTGGTTGTG
CCATATATGTCAGTGACAAGCCTGGAAACCATGACTTCAATCTGCTTAAGAAGCTTGTGCTT
CCTGATGGATCGATCCTGCGTGCAAAACTCCCCGGGAGACCAACAAGAGATTGCCTCTTCTC
GGATCCCGCAAGGGACGGCAAAAGCATTCTCAAGATATGGAACCTGAACGAACACTCTGGT
GTCATTGGCGCCTTCAACTGCCAAGGCGCCGGTTGGTGCCAGGTAGGGAAGAAGAACCTCA
TCCACGACGAGCAGCCCGGAACGGTGACCGGAGTCATCCGGGCACAGGATGTGGGCTACCT
TGCAAAGGTTGCTGATCACAGCTGGAACGGCGACGTGATCGTGTATTCGCACGTAGGAGGG
GAGGTGGTGTACCTGCCGAAGAACGCCTCGCTGCCTGTGACGCTGAGATCACGCGAGTACG
AGGTGTTCACCGTGGTCCCTCTGAAGCACCTGCCAAACGGCGTCTCCTTCGCACCGATCGGC
ATGGTCGGCATGTTCAACTCCGGTGGCGCGGTGAGGGAGGTGAGGTTCGGTGAGGATGCCG
ACGTCGAGCTCAAAGTGCGGGGCTCAGGCACGGTCGGCGCTTATTCCTCGACCAGGCCGAG
GAGTGTCGCCATCGATTCGAAGGCGGTTGGTTTTTGCTACGATGACGCCTGTGGTCTGGTCA
CCTTTGAGCTTGGCCTCCCTGAACAAGAACTGTACTTGTGGACAGTTTCAGTGGAGTACTGA

>*ScRFS1*_ Proteína

MTVGAGIAVQDGSLLALGAEVLREVRPNVLVTPAAGGGLTNGAFLGVRSAPAGSRSVFPVGKL
RDQRFMCTFRFKMWWMTQRMGSSGRDIPFETQFLIVEGTDGLQSTGEQPVVYTVFLPILEGSFR
AVLQGNADDELEICLESGDPDVESFEGSHLVFVGAGSDPFDVITNSVKVVERHLQTFSHREKKKS
SESFNLPQMPDMLNWFGWCTWDAFYTNVTAQGVKEGLQSFEKGGVSPRFVIIDDGWQSVAMD
PVGIACLSDNSANFANRLTHIKENHKFQKNGREGHREDDPAKGLAHIVNEIKGKHELKYVYVW
HAITGYWGGVRPGVVGMEHYESKMQQPVSSPGVQKNEPCDALDSITTNGMGLVNPERVFSFYN
ELHSYLASAGIDGVKVDVQNILETLGAGHGGRVLLARKYQQALEASVARNFPDNGIISCMSHNT
DNLYSSKRSAVIRASDDFWPRDPASHTIHIASVAYNTVFLGEFMQPDWDMFHSVHPMAEYHAA
ARAVGGCAIYVSDKPGNHDFNLLKKLVLPDGSILRAKLPGRPTRDCLFSDPARDGKSILKIWNLN
EHSGVIGAFNCQGAGWCQVGKKNLIHDEQPGTVTGVIRAQDVGYLAKVADHSWNGDVIVYSH
VGGEVVYLPKNASLPVTLRSREYEVFTVVPLKHLPNGVSFAPIGMVGMFNSGGAVREVRFGEDA
DVELKVRGSGTVGAYSSTRPRSVAIDSKAVGFCYDDACGLVTFELGLPEQELYLWTVSVEY

>*ScRFS2*_ Sequência Codificante

ATGACGATCACCTCATCCGTCAAGCTCGCTGGAGGCACGCTGTCAGTCTGCGGCCAGGCGAT
CCTGTCCGGCGTGCCCGCAGCCGTAGCGGCGTCCTCTGCGGCAGCGGTGAGAGCAGTCGAC
GGGGTCTTCCTCGAAGCCGACCTCGCCGAGTCAGCCGCCCGCCATGTCGTTTCCCTCGGCGC
CTTACGGGACGTGCGGTTCATGGCGTGTTTCCGGAGCAAGCTGTGGTGGATGTCGCAGCGGA
TGGGGGACAAGGGCGGCGACGTCCCACACGAGACGCAGTTCCTGCTCGTGGAGTCCAGGGG
CGCCGGCGGCAGCGGCGAGGACGCGGCGTACGTCGTGTTCCTCCCGCTCGTGGAGGGCGCG
TTCCGTGCCAGCCTCCAGGGCGGCGCGGGCGACGAGCTGGAGCTCTGCGTCGAGAGCGGGG
ACGCCGACACGCGCGCGGCGTCCTTCGAGCGCGCGCTCTTCGTGGGCGCCGCGGAGTCCGAT
CCCTTCGCGGCCATCGCCGGCGCCGTCGCCGCGGCCAAGTCAGCGATCAAGACGTTCCGGGT
CCGCGCCGAGAAGAAGCTCCCGGGCATCGTCGACTACTTCGGGTGGTGCACCTGGGACGCCT
TCTACCAGGACGTCACGCAGGAGGGCGTCGAGGCCGGGCTCCGCAGCCTCGTCGCCGGCGG
CGCGCCGCCCAAGTTCGTCATAATAGACGACGGCTGGCAGTCCGTAGGCACGGACCAACCC
AACCCCGACGACCCAGCAGGAGAGGCCAAGCAGCCGCGCTTGCCCCGGCTCACCGGCATCA
GGGAGAACAGCAAGTTCCAGAGACACGACGACCCGGCCGCCGGCATCCGCACGGTGGTGCG
CGCGGCGAAGGAAGAGTACGGCCTCAAGTACGTCTTCGTCTGGCACGCCATCACCGGTTACT
GGGGCGGTGTGCGTCCAGGCGCGGCCGGCACGGAGCAGTACCTCTCCAGCATGCAGTTCCC
CAAGATCTCGCCGGGAGTTGCCGAGAACGATCCCGGCATGAAAACCGATTGGATCACCGCC
CAAGGGGTCGGCCTCATGCACCCGCGCGCCGTGTACCGCTTCTACGACGACCAGCACGCGTA
CCTCGCCGCCGCCGGTGTCGACGGCGTCAAGGTGGACGAGCAGTGCATCCTGGAGACGCTC
GGCGCCGGCCACGGCGGCCGCGCGCAGCTCACGAGGCAATACCACCAGGCGCTCGACGCCT
CCGTCGCCAAGAACTTCCCGGAGAACGGCATCATCGCCTGCATGAGCCACAACACCGACGC
CCTCTACTGCTCGAAGCAGACGGCGGTGGTGAGAGCGTCAGATGACTTCTTCCCGAGGGACC
CAGCGTCGCACACGGTCCACATCGCCGCGGTGGCGTACAACAGCGTGTTCCTCGGCGAGTTC
ATGCTTCCGGACTGGGACATGTTCCACTCCCTCCACCCGGCCGGCGAGTACCATGGCTCGAC
CCGTGCGATCAGCGGCGGCCCTGTCTATGTCAGTGATGCCCCCGGCAAGCACGACTTCGAGC
TGCTGAAGAAGATCGTCTTGCCGGACGGCTCCGTGCTCCGTGCGCGTCTGCCTGGAAGGCCG
ACCAAGGACTGCCTGTTCACCGACCCGGCACGTGACGGTGTCAGCTTGCTCAAGATATGGAA
CATGAACAAGTTCACCGGCGTCCTCGGCGTGTACAACTGCCAGGGCGCGGCGTGGAGCTTCG
CGGAGAAGAAGACCGTGTTCCACCCGGCCGGCGCCGACGCCCTGACCTGCGGCGTCAGGGG
CAGCGACGTCCACCTCATCTCCGAGGCCGCGACGGACGCTGAGTGGAACGGCGACTGCGCC
GTGTACCGCCATGCCAGTGGCGACCTTGTCGTCCTCCCCAACGGCGTGGCACTGTCCGTCTC
CCTCAAGGTCCTCGAGCAAGACATCCTCACCGTCTCGCCGGTCAAGGAGTTGGCACCCGGGT
TCAGGTTCGCTCCGATCGGGCTCGTCGACATGTTCAACAGCGGCGCGGCGGTGGAAGGCCTG
ACGTACCACCTCCTCGACGGCGCAAAGCTGCTCGGCGACGACGGGTCCGCTTATAGCTCGGA
TGCCACCAGATTGGTGTGCGTGGAAGTGAGGGGGTGTGGCAGGTTCGGTGCCTACTCCTCGG
CCAGGCCAAGGAGATGTTTGCTGGGCTCTGCGCAGCTGGAGTTCACCTATGATTCTTCCTCC
GGCCTTGTTGTTCTGCAGCTGGAGGCGATGCCCAAGGAGAGGGTTCACAGGATTGTCATTGA
GCTGTAG

>*ScRFS2*_Proteína

MTITSSVKLAGGTLSVCGQAILSGVPAAVAASSAAAVRAVDGVFLEADLAESAARHVVSLGALR
DVRFMACFRSKLWWMSQRMGDKGGDVPHETQFLLVESRGAGGSGEDAAYVVFLPLVEGAFRA
SLQGGAGDELELCVESGDADTRAASFERALFVGAAESDPFAAIAGAVAAAKSAIKTFRVRAEKK
LPGIVDYFGWCTWDAFYQDVTQEGVEAGLRSLVAGGAPPKFVIIDDGWQSVGTDQPNPDDPAG
EAKQPRLPRLTGIRENSKFQRHDDPAAGIRTVVRAAKEEYGLKYVFVWHAITGYWGGVRPGAA
GTEQYLSSMQFPKISPGVAENDPGMKTDWITAQGVGLMHPRAVYRFYDDQHAYLAAAGVDGV
KVDEQCILETLGAGHGGRAQLTRQYHQALDASVAKNFPENGIIACMSHNTDALYCSKQTAVVR
ASDDFFPRDPASHTVHIAAVAYNSVFLGEFMLPDWDMFHSLHPAGEYHGSTRAISGGPVYVSDA
PGKHDFELLKKIVLPDGSVLRARLPGRPTKDCLFTDPARDGVSLLKIWNMNKFTGVLGVYNCQG
AAWSFAEKKTVFHPAGADALTCGVRGSDVHLISEAATDAEWNGDCAVYRHASGDLVVLPNGV
ALSVSLKVLEQDILTVSPVKELAPGFRFAPIGLVDMFNSGAAVEGLTYHLLDGAKLLGDDGSAYS
SDATRLVCVEVRGCGRFGAYSSARPRRCLLGSAQLEFTYDSSSGLVVLQLEAMPKERVHRIVIEL

>*ScRFS3*_ Sequência Codificante

ATGACGATCTCCTCGTCCGTCAAGCTCGCCGGCGGCACTCTGTCGGTGTGCGGGCGGACGGT
GCAGTCCGGGGTGCCGGACGCGGTGGTGGCCTCGTCGGCGGCGGCGGGGGGAGCGGTCGAC
GGGGTCTTCATCGGAGCCGACTTCGCCGCGCCGGCCGCCCGGCACGTCGTCTCCCTCGGCGA
CCTCAGGGGCGTGCGGTTCATGGCGTGCTTCCGGTTCAAGCTCTGGTGGATGGCGCAGCGAA
TGGGGGAGAATGGCGGCGACGTCCCGCGCGAGACCCAGTTCCTGCTCGTCGAGTCCAAGGG
CGCCGCCGGCGACAAGGCCGCGGTGGCGTACGTCGTGTTCCTGCCCCTCGTCGAGGGCGCGT
TCCGTGCCAGCCTCCAGGGCGGCGAGGGTGACACGCTCGAGCTCTGCGTCGAGAGCGGGGA
CACCGACACGCGCGCGGCGTCCTTCGAGCGCGCGCTCTTCGTGGGCGCCGCGGAGTCCGACC
CCTTCGCGGCCATCTCCGGCGCCGTCGCCACCGCCAAGTCCGCGCTCAGGACGTTCCGGGTC
CGCGCCGAGAAGAAGCTCCCGGGCATCGTCGACTACTTCGGCTGGTGCACCTGGGACGCCTT
CTACCAGGACGTCACCCAGGAGGGCGTCGAGGCCGGGCTCCGCAGCCTCATCGCCGGCGGC
GCGCCGCCCAAGTTCGTCATCATCGACGACGGCTGGCAGTCCGTCGGCACCGACAAGTCCGC
CGCCACCGAGACCGACGAACCTGCCGGAGAGGACAAGCCGCCGCTTCTGTCTCGACTCACC
GGCATCAAGGAGAACAGCAAGTTCCAGGACGTGGACGACCCGGCCGCCGGCATCAGGACGG
TGGTGCGCGCGGCGAAGGAGAAGTACGGGCTCAAGTACGTCTACGTGTGGCACGCGATCAC
CGGCTACTGGGGCGGCGTTCGGCCCGGCGAGCCCGGGACGGAGCACTACCGCTCCAGCATG
CAGTTCCCCAAGGTCTCGCCGGGCGTCATGGAGAACGAGCCCGGCATGAAGACCGACGTGC
TCACCGTGCAGGGTCTCGGCCTCGTGCACCCGCGCGCCGTGTACCGCTTCTACGACGAGCTC
CACGCGTATCTCGCGGCTGCCGGAGTCGACGGCGTCAAGGTGGACGTGCAGTGCATCCTGG
AGACGCTCGGCGCCGGCCACGGCGGCCGCGTGCAGCTCACCAGGCAGTACCACCAGGCGCT
CGACGCCTCCATCGCCAAGAACTTCCCGGAGAACGGCATCATCGCCTGCATGAGCCACAAC
ACCGACGCCCTCTACTGCTCCAAGCAGACGGCGGTGGTGAGGGCGTCGGACGATTTCTACCC
CAGGGACCCCGTGTCGCACACGATCCATATCACCTCGGTGGCATACAACAGCGTGTTCCTCG
GCGAGTTCATGCTCCCGGACTGGGACATGTTCCACTCGCTCCACCAGGCCGGCGACTACCAC

GGCTCGGCCCGCGCGATCAGCGGAGGCCCGGTCTACGTCAGTGATGCACCCGGGAAGCACA
ACTTCGAGCTGCTCAAGAAGATTGTCTTGCCCGACGGCTCCATTCTTCGCGCTCGTTTGCCAG
GCCGGCCGACCAAGGATTGCCTGTTCACCGACCCGGCACGCGACGGCGTCAGCCTGCTCAA
GATATGGAACATGAACAAGTTCACCGGCGTGCTCGGCGTGTACAACTGCCAGGGCGCGGCG
TGGAGCTCCGTGGAGAAGAAGAACACCTTCCACCATACCGGCACCGAGGCCCTGACCTGCG
GCGTCAAGGGCAGCGACGTCCACCTCATCTCCGAGGCCGCGACGGACCCCGAATGGAACGG
CGACTGCGCCCTGTACCGACATGCCGGTGGCGACCTCGTCGTCCTCCCGTGCGGCGCGGCGT
TGCCCGTCTCTCTCAAGGTCCTCGAACATGACATCCTCACCGTGTCACCCATCAAGGACTTG
GCACCTGGTGTCAGGTTTGCCCCGATCGGGCTGGTCGACATGTTCAATAGCGGTGGGGCTGT
GGAAGGCCTGACCTACCACCTCCTCGGCGGCGCAAAGCTGCTCGACGGCGGTAACGGTTCC
GCTTCGGTTTCCGAGGCTGTCGGGTTGGTGTGCATGGAGGTGAAGGGCTGTGGAAGGGCTGG
TGATTCTTTAGCTGGAGAAGATGCCCAAGGAGAGGGTTCACAAGATTGTTATTGA

>*ScRFS3*_ Proteína

MTISSSVKLAGGTLSVCGRTVQSGVPDAVVASSAAAGGAVDGVFIGADFAAPAARHVVSLGDL
RGVRFMACFRFKLWWMAQRMGENGGDVPRETQFLLVESKGAAGDKAAVAYVVFLPLVEGAF
RASLQGGEGDTLELCVESGDTDTRAASFERALFVGAAESDPFAAISGAVATAKSALRTFRVRAE
KKLPGIVDYFGWCTWDAFYQDVTQEGVEAGLRSLIAGGAPPKFVIIDDGWQSVGTDKSAATETD
EPAGEDKPPLLSRLTGIKENSKFQDVDDPAAGIRTVVRAAKEKYGLKYVYVWHAITGYWGGVR
PGEPGTEHYRSSMQFPKVSPGVMENEPGMKTDVLTVQGLGLVHPRAVYRFYDELHAYLAAAG
VDGVKVDVQCILETLGAGHGGRVQLTRQYHQALDASIAKNFPENGIIACMSHNTDALYCSKQTA
VVRASDDFYPRDPVSHTIHITSVAYNSVFLGEFMLPDWDMFHSLHQAGDYHGSARAISGGPVYV
SDAPGKHNFELLKKIVLPDGSILRARLPGRPTKDCLFTDPARDGVSLLKIWNMNKFTGVLGVYN
CQGAAWSSVEKKNTFHHTGTEALTCGVKGSDVHLISEAATDPEWNGDCALYRHAGGDLVVLP
CGAALPVSLKVLEHDILTVSPIKDLAPGVRFAPIGLVDMFNSGGAVEGLTYHLLGGAKLLDGGN
GSASVSEAVGLVCMEVKGCGRAGDSLAGEDAQGEGSQDCY

Anexo IV – Sequência do gene de Estaquiose Sintase em cana-de-açúcar

>*ScSTS1*_Sequência Codificante

ATGGCTCCCAACCTCAGCAAGACGACGCCTGCTGGCCTCCTAGGCGGCGACGAAGTGGCCC
CGGTGGAGGGCCTGAAGCCGTCACGGTTCACGCTCAAGGGCAAGGACCTGGCCGTGGACGG
CCACCCGTTCCTGCTGGACGTGCCGGCCAACATCCGGCTTACCCCTGCATCGACGCTCGTGC
CCGCCGCGGCCGCCCCCGCGGCGGCCGGCGACGGCAGCTTCCTCGGCTTCGACGCGGCGGC
GGCCAAGAGCCGGCACGTGGTCCCCGTCGGCAGGCTCCGTGACATTCGGTTCATGAGCATCT
TCCGCTTCAAGGTGTGGTGGACCACCCACTGGGTGGGCGACAACGGCAGGGACGTGGAGAA
CGAGACGCAGATGATGGTGCTCGACCGCTCCGAGTCCGGCAGCGGCGGCGGGCGTCCCTAC
GTGCTGCTGCTCCCCATCATCGAGGGCTCGTTCCGGGCCTGCCTGGAGGCCGGGAAGGCGGA
CGACTACGTGGACCTGTGCGTGGAGAGCGGGTCCTCGTCCGTGCGCGGCGCCGCGTTCCGGA

GCGCTCTGTACCTGCACGCCGGCGACGACCCGTTCGAGCTCGTCGCGGACGCCGTCAGGGTG
GTCCGCGCGCACCTGGGCACGTTCCGGACCATGGACGAGAAGACGCCGCCGCCGATCGTGG
ACAAGGGTGTGGGAGGCGTGCGCCGCCTGGCGGAGGGCGGGTGCCCGCCGGGGCTGGTGCT
CATCGACGACGGCTGGCAGTCCATCTGCCACGACGAGGACGACCCGGCCAGCGGCGAGGAA
GGCATGAACCGCACCTCCGCCGGCGAGCAGATGCCGTGCCGGCTCATCAAGTTCCAGGAGA
ACCACAAGTTCAGGGAGTACAAGCAGGGCGGGATGGGCGCGTTCGTGCGGGAGATGAAGGC
GGCGTTCCCGACCGTGGAGCAGGTGTACGTGTGGCACGCGCTGTGCGGGTACTGGGGCGCCT
CCGCCCCGGCGCGCCCGGCCTGCCGCCGGCCAAGGTGGTGGCGCCCAAGCTATCCCCGGGA
CTGCAGCGCACCATGGAGGACCTCGCTGTCGACAAGATCGTCAACAACGGCGTCGCCTCGTC
GACCCCAAGCGCGCGCACGAGCTCTACGAGGGCTTGCACTCCCACCTCCAGCCTCCGGCATC
GACGGCGTCAAGGTCGACGTCATTCACTTGCTGGAGATGCTGTGCGAGGAGTACGGCGGCC
GCGTTGAGCTCGCCAAGGCCTACTTCGCCGGTCTGACGGCGTCGGTGCGTCGGCACTTCGGC
GGCAACGGCGTGATCGCGAGCATGGAGCACTGCAACGACTTCATGCTGCTGGGCACGGAGG
CGGTGGCGCTGGGCCGCGTGGGCGACGACTTCTGGTGCACGGATCCCTCCGGCGACCCCAAC
GGCACCTTCTGGCTGCAGGGGTGCCACATGGTGCACTGCGCCTACAACTCGCTGTGGATGGG
CAACTTCATCCACCCGGACTGGGACATGTTCCAGTCCACGCACCCCTGCGCCGCCTTCCACG
CCGCCTCCCGCGCCGTCTCCGGCGGGCCCATCTACGTCAGCGACTCGGTGGGGCAGCACGAC
TTCGCGCTGCTCCGCCGCCTGGCGCTCCCCGACGCACCCCTGCTCAAGATCTGGAACGTGAA
CAAATGCACTGGCGTGGTGGGCGTGTTCAACTGCCAGGGCGCCGGGTGGTGCCGCGTGACC
AAGCGGACGCGCGTGCACGACGCGGCGCCGGGCACGCTGACCGGCATCGTGCGCGCCGACG
ACGTCGACGCCATAGCGCGCGTCGCCGGCGACGGCACCGACGACGACGGCGGTAACGGGTG
GGACGGCGAGGCCGTGGTGTACGCGCACCGCGCGCGGGAGCTGGTGCGGCTGCCCCGGGGC
GCCGCGCTGCCCGTGACGCTGGGCCCGCTCCAGTACGAGGTGTTCCACGTCTGCCCGCTCCG
CGCCGCCGCGCCGGGGGTGGCGTTCGCGCCCGTCGGGCTGCTCGATATGTTCAACGCCGGGG
GCGCCGTCGAGGAGTGCCGCGCCGTGGACGGCGGCGGGAAGGCCGTGGTGGCGCTCAGGGT
GCGCGGGTGCGGCCGGTTCGGCGCCTACTGCTCGCGGGAGCCGGCGAGGTGCCTGCTGGAC
TCGGCGGAAGTGGAGTTCGGCTACGACGCCGACACCGGCCTCGTGTCCGTCGACCTGCCCGT
GCCGGAGCAGGAGATGTACCGGTGGACGCTGGAGATTGTGGTCTAG

>*ScSTS1*_Proteína

MAPNLSKTTPAGLLGGDEVAPVEGLKPSRFTLKGKDLAVDGHPFLLDVPANIRLTPASTLVPAA
AAPAAAGDGSFLGFDAAAAKSRHVVPVGRLRDIRFMSIFRFKVWWTTHWVGDNGRDVENETQ
MMVLDRSESGSGGGRPYVLLLPIIEGSFRACLEAGKADDYVDLCVESGSSSVRGAAFRSALYLH
AGDDPFELVADAVRVVRAHLGTFRTMDEKTPPPIVDKGVGGVRRLAEGGCPPGLVLIDDGWQSI
CHDEDDPASGEEGMNRTSAGEQMPCRLIKFQENHKFREYKQGGMGAFVREMKAAFPTVEQVY
VWHALCGYWGASAPARPACRRPRWWRPSYPRDCSAPWRTSLSTRSSTTASPRRPQARARALRG
LALPPPASGIDGVKVDVIHLLEMLCEEYGGRVELAKAYFAGLTASVRRHFGGNGVIASMEHCND
FMLLGTEAVALGRVGDDFWCTDPSGDPNGTFWLQGCHMVHCAYNSLWMGNFIHPDWDMFQS
THPCAAFHAASRAVSGGPIYVSDSVGQHDFALLRRLALPDAPLLKIWNVNKCTGVVGVFNCQG
AGWCRVTKRTRVHDAAPGTLTGIVRADDVDAIARVAGDGTDDDGGNGWDGEAVVYAHRARE

LVRLPRGAALPVTLGPLQYEVFHVCPLRAAAPGVAFAPVGLLDMFNAGGAVEECRAVDGGGKA
VVALRVRGCGRFGAYCSREPARCLLDSAEVEFGYDADTGLVSVDLPVPEQEMYRWTLEIVV