

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DA TREALOSE-6-FOSFATO SINTASE (TPS)
EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp) SOB ESTRESSE
HÍDRICO**

Nilson Nicolau Junior

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho 2008

Nicolau Junior, Nilson
N639e Expressão da trealose-6-fosfato sintase (TPS) em cana-de-
açúcar (*Saccharum* spp) sob estresse hídrico / Nilson Nicolau Junior.
-- Jaboticabal, 2008
ix, 49 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Sonia Marli Zingaretti
Banca examinadora: Janete Aparecida Desiderio Sena, Miriam
Vergínia Lourenço
Bibliografia

1. *Saccharum* spp. 2. TPS. 3. estresse hídrico. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:633.61

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NILSON NICOLAU JUNIOR – nascido em 28 de dezembro de 1981, na cidade de Jaboticabal – SP, filho de Nilson Nicolau e Marlene Aparecida Calçada Nicolau. Formou-se biólogo pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” UNESP – Assis, em dezembro de 2004. Durante o curso de graduação trabalhou na área de microbiologia (fermentação alcoólica) sob a orientação do Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto, e em 2006 ingressou no curso de pós-graduação na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (UNESP).

"O Importante não é a perfeição com a qual conseguimos realizar o que deve provir da vontade e sim, que o que tiver de surgir nesta vida, por mais imperfeito que venha parecer, seja feito uma vez, para que haja um começo."

Rudolf Steiner

À minha namorada Mariana que sempre me deu força, incentivo e amor o que é e sempre foi fundamental para minha carreira e para minha vida.

Aos meus pais Nilson e Marlene que desde sempre me apoiaram nos estudos, e me deram muito amor e coragem para enfrentar as adversidades.

Aos meus irmãos Andréa, André e a minha sobrinha Bianca pelo apoio, amor e companherismo que sempre foram fundamentais para mim.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram no meu projeto de Mestrado e na minha vida pessoal.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À UNESP-FCAV e à professora Sonia Marli Zingaretti pela oportunidade de cursar o mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

À professora Maria Inês Tiraboschi Ferro e todo o pessoal do LBM, pelo apoio e pela amizade.

Aos professores componentes da banca de qualificação: Dr. Manuel Vitor Franco Lemos e Dr. Mozart de Azevedo Marins, pela disponibilidade de participar da banca e pelas correções e contribuições ao trabalho.

Aos professores componentes da Comissão Examinadora: Dra. Janete Aparecida Desidério Senna e Dra. Mirian Verginia Lourenço, pela disponibilidade de participar da comissão examinadora e pelas correções e contribuições ao trabalho.

À Anna Carolina, Fabiana e Marilza, por toda ajuda no decorrer do projeto e pela amizade.

À minha namorada Mariana Sant'Anna Pereira, pelo apoio e ajuda no desenvolvimento do projeto e pela motivação.

À minha família, meus pais e irmãos que sempre me apoiaram nos estudos.

Ao CNPq e à FAPESP pelo suporte financeiro durante desenvolvimento do projeto.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	viii
SUMMARY	ix
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVO.....	4
III. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 Cana-de-açúcar	5
3.2 Estresse hídrico	6
3.3 Via de Biossíntese da trealose	8
3.4 RT-PCR semiquantitativo	11
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Instalação do experimento.....	12
4.2 Coleta das amostras	12
4.3 Extração de DNA Plasmidial.....	13
4.4 Sequenciamento do cDNA.....	14
4.4.1 Reação de PCR.....	14
4.4.2 Precipitação da reação de sequenciamento	14
4.5 Bioinformática	15
4.6 Expressão in silico	15
4.7 Extração do RNA total	16
4.7.1 Quantificação do RNA total.....	17
4.7.2 Análise da integridade do RNA total	17
4.8 Preparo do cDNA.....	17
4.9 Reação de RT-PCR semiquantitativo	18
V. RESULTADOS.....	20
5.1 Extração de DNA plasmidial	20
5.2 Extração do RNA.....	21
5.3 Identificação e dedução da sequência de aminoácidos das ESTs	22
5.4 Domínios Conservados e Dendrograma.....	26
5.5 Expressão dos genes TPS	31
VI. DISCUSSÃO	36
6.1 Expressão in silico da TPS em cana-de-açúcar	36
6.2 Genes da TPS de <i>Saccharum</i> spp	36
6.3 Expressão das TPSs em <i>Saccharum</i> spp.....	37
VII. CONCLUSÕES	40
VIII. REFERÊNCIAS.....	41

EXPRESSÃO DA TREALOSE-6-FOSFATO SINTASE (TPS) EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp*) SOB ESTRESSE HÍDRICO

RESUMO - O acúmulo de um açúcar com propriedades osmoprotetoras, a trealose (α -D-glicopiranosil-[1,1]- α -D-glicopiranosose), é muito comum em microorganismos, invertebrados e em algumas plantas superiores. A trealose é sintetizada a partir da UDP-glicose e glicose-6-fosfato num processo de dois passos onde atuam duas enzimas principais, trealose-6-fosfato sintase ou TPS e trealose-6-fosfato fosfatase ou TPP. A TPS e o seu produto a trealose-6-fosfato (T6P) são prováveis sinalizadores para o metabolismo de carboidratos, contribuindo para o aumento da tolerância de plantas ao estresse hídrico. Este trabalho analisou a expressão *in silico* a partir de 110 transcritos de TPS isolados de bibliotecas de tecidos e tratamentos distintos provenientes do projeto SUCEST. Dois destes genes relacionados a TPS, o STPS1 e o STPS2 apresentaram expressão diferencial em estudos anteriores em cana-de-açúcar sob estresse hídrico. Em plantas as TPSs foram divididas em duas subfamílias (classe I e II). Em cana-de-açúcar a STPS1 pertence aos genes de classe I, pois, não possuem domínio fosfatase (TPP) ativo, enquanto que a STPS2 possui domínios TPP ativos (classe II) determinados pela presença de fosfatase “boxes”. Análises de expressão, baseadas no método de RT-PCR semiquantitativo, foram realizadas com os genes STPS1 e STPS2 em plantas sensíveis e tolerantes ao déficit hídrico nos períodos iniciais de estresse (24h, 72h e 120h). Os resultados mostram que o gene STPS1 é induzido em cultivares tolerantes de cana-de-açúcar sob estresse e reprimido em plantas sensíveis. Já o gene STPS2 não apresenta variações consideráveis nos níveis de expressão para os mesmos tratamentos.

Palavras-Chave: EST, estresse hídrico, expressão diferencial, *Saccharum spp*, TPS

TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE (TPS) EXPRESSION IN SUGARCANE (*Saccharum* spp) UNDER WATER STRESS.

SUMMARY - The accumulation of a sugar with osmoprotectant properties, the trehalose (α -D-glucopyranosyl-[1,1]- α -D-glucopyranoside), is very common in microorganisms, invertebrates and in some higher plants. Trehalose is synthesized from the UDP-glucose and glucose-6-phosphate in a process of two steps where two main enzymes act, trehalose-6-phosphate synthase or TPS and trehalose-6-phosphate phosphatase or TPP. The TPS and its product the trehalose-6-phosphate (T6P) are probable signaling molecules in the carbohydrate metabolism, contributing to enhance the plants tolerance to water stress. This work analyzed the *in silico* expression from 110 transcripts of TPS acquired from different libraries of tissues and treatments proceeding from the SUCEST project. The result showed that the TPS gene is present in all tissues of the plant. Two of these TPS genes, the STPS1 and the STPS2 showed differential expression in previous studies in sugarcane under water stress. In plants the TPSs are divided in two subfamilies (class I and II). In sugarcane the STPS1 belongs to the class I genes, therefore, it does not have an active phosphatase (TPP) domain, whereas, the STPS2 has an active TPP domain (classroom II) determined by the presence of phosphatase boxes. Expression analyses, based in the semi-quantitative method of the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), were performed with the STPS1 and STPS2 genes in water-stress susceptible and tolerant sugarcane cultivars in the initial periods of stress (24h, 72h and 120h). The results show that the STPS1 gene is up-regulated in the tolerant cultivar under stress and down-regulated in susceptible plants. The STPS2 gene does not show considerable variations in the expression levels under the same treatments.

Keywords: differential expression, EST, *Saccharum* spp, TPS, water stress

I. INTRODUÇÃO

A trealose (α -D-glicopiranosil-[1,1]- α -D-glicopiranoose) um dissacarídeo não redutor comumente encontrado em bactérias, fungos e invertebrados, é sintetizado a partir da UDP-glicose e glicose-6-fosfato num processo de dois passos onde atuam duas enzimas principais, trealose-6-fosfato sintase e trealose-6-fosfato fosfatase (CABIB; LELOIR, 1958; THEVELEIN, 1996). A biossíntese de trealose compreende a formação de trealose-6-fosfato (T6P) a partir de UDP-glicose e glicose-6-fosfato pela ação da enzima trealose-6-fosfato sintase (TPS) subseqüentemente a enzima trealose-6-fosfato fosfatase (TPP) atua sobre a trealose-6-fosfato formando a trealose. Esse açúcar tem se mostrado como uma molécula protetora em resposta a diversas condições de estresse em um amplo número de microorganismos. Em bactérias como *E. coli* o acúmulo de trealose é de extrema importância para a manutenção da viabilidade em temperaturas baixas (KANDROR et al. 2002). Também em leveduras, evidências acumuladas nos últimos anos indicam que o nível intracelular de trealose pode determinar a resposta ao estresse e a sobrevivência da levedura sob condições ambientais extremas (VAN LAERE, 1989; WIEMKEN, 1990). Até recentemente a presença de trealose em angiospermas era questionada exceto pela descoberta deste açúcar em folhas de plantas resistentes a dissecação tal como *Myrothamus flabellifolius* (BIANCHI et al., 1993; DRENNAN et al. 1993). Porém, durante os últimos anos, genes envolvidos na biossíntese de trealose foram identificados em angiospermas como *Arabidopsis thaliana* (BLAZQUEZ et al. 1998; LEYMAN et al. 2001 VOGEL et al. 2001), arroz, batata (GODDIJN; SMEEKENS 1998) e algodão (KOSMAS et al. 2006). Leyman (2001) encontrou 11 genes homólogos da TPS presumivelmente funcionais no genoma de *Arabidopsis*. Estes genes foram divididos em duas subfamílias (classe I e classe II) pela presença ou não de fosfatase “boxes”, domínios conservados presentes normalmente nos genes que codificam a TPP (LDYD|GD|T|LM| e GDDRSD, THALLER et al. 1998).

Pesquisas recentes com *A. thaliana* mostraram que um intermediário da via de biossíntese da trealose, a T6P é indispensável para a utilização de carboidrato disponível durante o crescimento e desenvolvimento da planta e da flor (EASTMOND et al. 2002; SCHLUEPMANN et al. 2003, 2004; VAN DIJKEN et al. 2004). Há também uma forte evidência de que a enzima TPS atua também como uma molécula sinalizadora (SCHLUEPMANN et al. 2003). A trealose é um osmoprotetor eficiente em muitos organismos, porém de acordo com Kosmas et al. (2006) o aumento da resistência ao estresse, em plantas transgênicas que superexpressaram genes da via biossintética da trealose, é atribuído erroneamente ao acúmulo deste carboidrato, visto que, sua concentração na planta não seria suficiente para uma ação osmoprotetora. Avonce et al. (2004) verificaram que a superexpressão do gene AtTPS1 (classe I) em *A. thaliana* conferiu tolerância à seca sem causar mudanças morfológicas na planta, além disso, essas plantas manifestavam fenótipos insensíveis à presença de glicose e de ABA, quando estes eram adicionados ao meio de cultura, provavelmente devido a uma ação da trealose-6-fosfato ou da AtTPS1 que estão envolvidas na regulação de genes da sinalização da glicose e do ABA. A transformação de plantas de tabaco, com o mesmo gene de Arabidopsis, conferiu aumento de tolerância a diversos tipos de estresse, tais como, seca, dissecação, baixas temperaturas e salinidade (ALMEIDA et al. 2005). Pesquisas feitas por Chary et al. (2008) demonstraram que o gene AtTPS6 (classe II), de *A. thaliana*, complementa mutantes com defeitos para o fenótipo da forma das células (*csp-1*), sendo assim é importante no controle da morfogênese celular. Zhang et al. (2006) transformaram plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com o gene TPS oriundo de um cogumelo (*Grifola frondosa*) e constataram aumento na tolerância ao estresse hídrico além de alta produtividade dos transgênicos em condições de seca.

A cana-de-açúcar é uma das mais importantes culturas mundiais, só no Brasil foram produzidas cerca de 473 milhões de toneladas na safra 2007/2008 (UNICA, 2008). Um dos fatores que influenciam muito a produtividade da cultura da cana-de-açúcar é o regime de chuva. Períodos prolongados de seca levam a queda na

produtividade, assim sendo, o estresse hídrico aparece como um dos fatores mais importantes no manejo da produtividade dessa cultura. Nas plantas o déficit hídrico gera um complexo de respostas iniciado pela percepção do estresse, o qual leva a uma cascata de eventos moleculares culminando em diversos níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (BRAY, 1993). As variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil são híbridas, resultado do cruzamento interespecífico entre *Saccharum officinarum*, *S. barbieri*, *S. sinense* e as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum*. Em virtude da origem múltipla a cana-de-açúcar apresenta um dos genomas mais complexos do reino vegetal, com um número diplóide de cromossomos que varia de 100 a 130 (D'HONT et al. 1996). Frente à dificuldade de se trabalhar com o genoma da cana, a geração de um banco de 237.954 ESTs (Etiquetas de Seqüências Expressas) durante o projeto SUCEST (VETTORE et al. 2001), possibilitou um incremento nos estudos moleculares envolvendo genes específicos de cana-de-açúcar. O estudo destas seqüências gerou uma ampla quantidade de dados que podem ser utilizados para a compreensão de vias metabólicas e um conjunto de processos biológicos importantes, que podem ser usados no melhoramento genético e no aperfeiçoamento de cultivares de cana de açúcar.

Resultados obtidos da análise de membranas de alta densidade (macroarranjo), contendo genes de cana-de-açúcar hibridizadas com RNA extraído de amostras foliares de cultivares (SP90-1638 sensível e SP83-2847 tolerante) contrastantes para o caráter resistência ao estresse, possibilitaram a identificação de ESTs similares a TPS com expressão diferencial. Neste trabalho foram realizadas análises de expressão, por RT-PCR semi-quantitativo, dos genes TPS1 e TPS2 de *Saccharum* spp (STPS1 e STPS2 respectivamente) com amostras foliares provenientes dos cultivares tolerante e sensível submetidas a estresse hídrico nos períodos de 24, 72 e 120 horas (T1, T2, T3 respectivamente), visando a confirmação de expressão diferencial.

II. OBJETIVO

Devido à importância da via da trealose recentemente descoberta em plantas este trabalho teve como objetivos:

- Analisar as ESTs relacionadas a TPS geradas pelo projeto SUCEST.
- Conhecer a sequência de nucleotídeos dos clones provenientes das ESTs estudadas, através de seqüenciamento.
- Inferir sobre sua função baseado na determinação *in silico*.
- Analisar a expressão, por RT-PCR semi-quantitativo, dos genes TPS1 e TPS2 de *Saccharum* spp sob déficit hídrico.

III. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, é originária do Sudoeste Asiático, das regiões de Nova Guiné e Indonésia. No Brasil a cana-de-açúcar cultivada é um híbrido interespecífico (*Saccharum* spp), resultado do cruzamento entre *Saccharum officinarum*, *S. barbieri*, *S. sinense* e as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum*. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o maior exportador de açúcar e álcool, possuindo uma área de cultivo de, aproximadamente, 6,5 milhões de hectares. O etanol brasileiro é atualmente uma promissora alternativa de energia renovável, limpa e não poluente. A estimativa da produção nacional de cana-de-açúcar na safra 2007/2008 é de 473,16 milhões de toneladas, das quais 46,92% (221,99 milhões de toneladas) são para a fabricação de açúcar e 53,08% (251,17 milhões de toneladas) são para a produção de álcool. Desse total o estado de São Paulo é responsável por 58,87% da produção (278,55 milhões de toneladas) (CONAB, 2008). Além da produção de açúcar e álcool, um subproduto da cana, o bagaço, também vem sendo utilizado na co-geração de energia, produzindo vapor, com flexibilidade para ser transformado em outras formas de energia, como calor, eletricidade ou tração mecânica. Alternativamente à co-geração, o bagaço ainda pode ter uso fora das usinas e destilarias, como insumo volumoso de ração animal, na fabricação de papel, na fabricação de elementos estruturais e até na produção de álcool combustível adicional, por hidrólise (MAPA, 2008).

O sucesso na incorporação de diversos caracteres desejáveis nos híbridos de cana-de-açúcar, principalmente, alta produção e crescimento vigoroso, tem sido atingido pelo uso de cruzamento e prospecção tradicionais (BOSCH, 2006). No Brasil existem diversas variedades de cana-de-açúcar sendo utilizada, a maioria foi criada a

partir de programas de melhoramento por centros de pesquisa e estações experimentais como o Instituto Agrônomo de Campinas e a Copersucar (SACIOTO, 2003). Atualmente, a evolução nos estudos de biologia molecular permitiram o uso de técnicas avançadas de genética que vem facilitando e agilizando os programas de melhoramento de plantas. No caso da cana-de-açúcar cultivada, que possui um dos genomas mais complexos do reino vegetal, o projeto SUCEST (VETTORE et al. 2001) gerou milhares de etiquetas de seqüência transcrita (ESTs) que vem sendo utilizadas no entendimento da expressão de genes diversos e no melhoramento com auxílio das ferramentas de genética molecular modernas.

3.2 Estresse hídrico

Um dos principais fatores que levam a queda da produção mundial no campo é o estresse causado pelo déficit hídrico. No Brasil, a cana-de-açúcar, com seu ciclo semi-perene, sofre a influência de diversos fatores climáticos, como as secas, durante todo o ano. Com altas taxas fotossintéticas, devido ao seu metabolismo C4, a cana apresenta elevado consumo de água, necessitando de 250 partes de água para formar uma parte de matéria seca da planta (DILLEWJIN, 1952). Apesar da maioria das regiões canavieiras do Brasil apresentarem um volume adequado de chuvas para a cultura, estimado entre 1200 e 1500 mm anuais (OMETTO, 1980), a distribuição pluviométrica é bastante irregular, o que pode levar a períodos de déficit hídrico no solo e conseqüente queda na produtividade.

A disponibilidade de água no solo influencia processos vitais que ocorrem nas plantas, assim, a falta ou excesso desta afetam de maneira decisiva o desenvolvimento dos mesmos, pois alteram a absorção de nutrientes e da própria água (CALVACHE et al. 2007; REICHARDT, 1996). O déficit hídrico leva a um complexo de respostas que afetam o metabolismo da planta. Por sua vez essas respostas dependem de diversos fatores como severidade e duração do estresse,

genótipo da planta, estágio de desenvolvimento e fatores ambientais responsáveis pelo estresse (BRAY, 1993).

Para conservar água, nutrientes e carboidratos necessários para a sobrevivência, às plantas apresentam modificações morfológicas em resposta ao estresse hídrico, como a redução da expansão foliar e o fechamento dos estômatos. Já as raízes continuam a crescer, para que a planta continue tendo acesso à água no solo (WILKINSON e DAVIES, 2002).

A falta de água nas células das plantas leva a processos regulatórios que são iniciados para ajustar o metabolismo celular às novas condições celulares. Essas numerosas respostas ao déficit hídrico são geradas pela atuação de um conjunto de genes com várias funções diferentes (BRAY, 1993). Os genes expressos em resposta à seca podem ser divididos em dois grupos. O primeiro codifica proteínas que aumentam a tolerância ao estresse como proteínas de canais de água, transportadores e enzimas detoxificantes. O segundo grupo inclui diferentes proteínas com função regulatória tal como fatores de transcrição, quinases, fosfatases e enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolípidios e na biossíntese do ABA (KARIM, 2007). Os genes expressos durante o estresse promovem tolerância celular à desidratação através de ações protetoras no citoplasma, alteração no potencial hídrico, para promover a captação de água, controle da acumulação de íons e também a própria regulação da expressão gênica (BRAY, 1993).

A análise molecular da resposta ao déficit hídrico chegou num estágio onde a pesquisa pode estudar uma ampla coleção de genes caracterizados. O uso de novas abordagens em genética direta e reversa, e o desenvolvimento de ferramentas genômicas e proteômicas vem acelerando o entendimento das respostas metabólicas da planta sob estresse hídrico.

3.3 Via de Biossíntese da trealose

A trealose (α -D-glicopiranosil-[1,1]- α -D-glicopiranoose) é um dissacarídeo não redutor comumente encontrado em bactérias, fungos e invertebrados que é sintetizado a partir da UDP-glicose e glicose-6-fosfato numa via de dois passos onde atuam duas enzimas, a trealose-6-fosfato sintase (TPS) e a trealose-6-fosfato fosfatase (TPP) (CABIB e LELOIR 1958; THEVELEIN, 1996). Além de ser uma fonte de carbono e funcionar como açúcar de reserva para alguns microorganismos como as leveduras, a trealose é conhecida por possuir efeitos osmoprotetores, protegendo a célula de diversos tipos de estresse.

Diferente dos microorganismos e invertebrados, os genes da TPS de plantas, descobertos recentemente, possuem regiões conservadas com domínios TPS e TPP, o que leva a crer, que durante a evolução das plantas houve uma fusão dos genes que codificam as duas enzimas da via. O primeiro relato completo dos genes da via da trealose em plantas foi feito por LEYMAN et al. (2001) em *Arabidopsis thaliana* onde foram encontradas 11 isoformas para o gene da TPS e 2 para o gene da TPP. Além disso, foi possível dividir os genes TPS de *Arabidopsis* em duas subfamílias: as que possuem domínio TPP inativo (classe I) e as que possuem domínio TPP ativo (classe II), caracterizados pela presença de “boxes” fosfatase (LDYD|GD|T|LM| e GDDRSD, THALLER et al. 1998). Além disso, uma terceira classe foi criada para alocar os genes das enzimas TPP (Tabela 1).

Tabela 1. Genes da via da trealose e seus respectivos domínios conservados em *Arabidopsis thaliana* (EASTMOND et al. 2003)

Gene	Domínio TPS	Domínio TPP	"Boxes" fosfatase
Classe I	+	+	-
AtTPS1	+	+	-
AtTPS2	+	+	-
AtTPS3	+	+	-
AtTPS4	+	+	-
Classe II	+	+	+
AtTPS5	+	+	+
AtTPS6	+	+	+
AtTPS7	+	+	+
AtTPS8	+	+	+
AtTPS9	+	+	+
AtTPS10	+	+	+
AtTPS11	+	+	+
Classe III			
AtTPPA	-	+	+
AtTPPB	-	+	+

Descobertas recentes têm trazido valiosas considerações sobre a influência da trealose no metabolismo do carboidrato em plantas. A via da trealose era vista como fisiologicamente importante apenas em algumas plantas especializadas, conhecidas como planta de ressurreição (MULLER et al. 1995; ZENTELLA et al. 1999), porém hoje ela é considerada ubíqua nas plantas superiores (LEYMAN et al. 2001).

Exceto nas plantas de ressurreição, os níveis de trealose obtidos nas plantas superiores não possuem correlação com a tolerância a estresse. Esta falta de correlação pode se dar devido a ela não ser o composto ativo e sim a trealose-6-fosfato (T6P). A T6P, um intermediário da via da trealose formada pela ação da enzima TPS, é, segundo Schluepmann et al. (2003, 2004), indispensável para a utilização de carboidrato disponível durante o crescimento e desenvolvimento da planta e está intimamente relacionada com a percepção de estresses nutricionais, bióticos e abióticos (Figura 1).

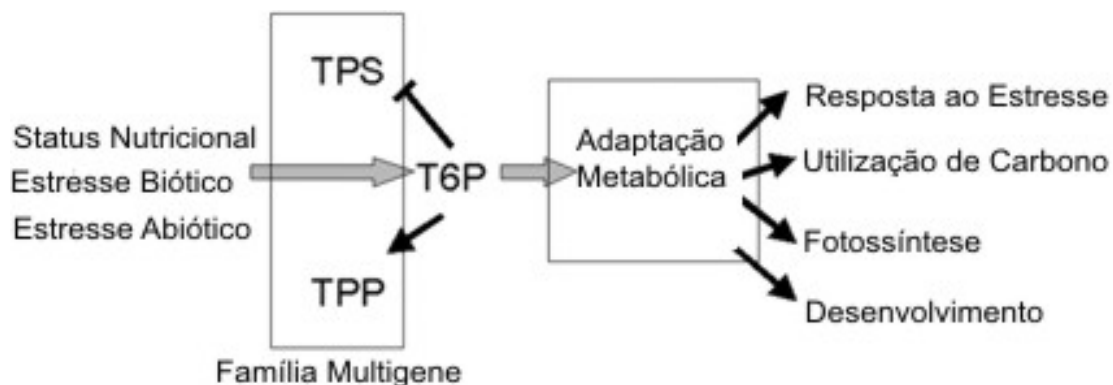


Figura 1. Sinalização da T6P em resposta ao status nutricional, e a estresses bióticos e abióticos (SCHLUEPMANN et al. 2004).

Além da T6P o gene TPS parece ser importante no controle do status de carbono na planta e resposta ao estresse. Em *Arabidopsis* a superexpressão do AtTPS1, um gene TPS classe I, além de mostrar-se como um regulador de carboidrato e do hormônio ABA apresentou uma possível função de sinalizador do estresse (AVONCE et al. 2004).

Num dos primeiros estudos de transgênia com a TPS, o gene TPS1 de *E. coli* (*otsA*) foi superexpresso em tabaco, onde a trealose acumulou-se em pequenas quantidades, e a planta apresentou um fenótipo tolerante a seca, porém, com modificações morfológicas (GODDIJN et al. 1997). Já plantas de tabaco transformadas com o gene AtTPS1 obtiveram aumento de tolerância a diversos tipos de estresse, tais como, seca, dissecação, baixas temperaturas e salinidade (ALMEIDA et al. 2005). Estudos feitos por Zhang et al. (2006) com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) transgênica para TPS de um cogumelo (*Grifola frondosa*) também apresentaram aumento na tolerância ao déficit hídrico.

Já é comprovado que manipulação da via da biossíntese da trealose pode potencialmente aumentar a tolerância à seca em plantas (ZHANG et al. 2006).

Ultimamente o gene da TPS tem sido visto como um dos genes alvo no melhoramento genético visando o aumento de tolerância a diversos tipos de estresse.

3.4 RT-PCR semiquantitativo

Muitas vezes uma análise meramente qualitativa da expressão do RNA não é suficiente para responder a pergunta dos pesquisadores, mas sim, uma análise onde se detecte de variação dos níveis de expressão em diferentes condições experimentais (MARONE et al. 2001). A reação em cadeia da polimerase (PCR) afetou dramaticamente os estudos moleculares, simplificando as tarefas laboratoriais e permitindo o avanço na identificação de genes novos e na quantificação de seqüências específicas de nucleotídeos (ERLICH et al. 1991). Atualmente, estratégias como a transcrição reversa associada à reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) vem contribuindo para estudos de expressão através de cDNAs produzidos pela ação da transcriptase reversa sobre o RNA. O RT-PCR semiquantitativo é uma técnica, rápida, altamente sensível e útil para a detecção de transcritos raros e na análise de pequenas quantidades de amostra (CARDING et al. 1992).

Além do RT-PCR semiquantitativo outros dois métodos, “Nothorn blotting” e RT-PCR quantitativo (QRT-PCR), são usados na quantificação de transcritos. O método “Nothorn blotting” requer maiores quantidades de RNA total e consome muito tempo (FREEMAN et al, 1999), já o QRT-PCR é o método mais avançado na quantificação de transcritos e mais eficiente que o RT-PCR, porém é o de custo mais alto por requerer equipamentos e reagentes de custo elevado.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instalação do experimento

O experimento foi instalado em casa de vegetação do departamento de Tecnologia da FCAV/(UNESP), com temperatura e umidade controlada (regime de dia e noite). Foram utilizados no presente estudo duas cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp), sendo uma classificada como tolerante ao déficit hídrico (cv SP83-2847) e a outra sensível (cv SP90-1638). A classificação de tolerância e sensibilidade para os cultivares é proveniente de estudos realizados no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). Os toletes foram cultivados durante 39 dias em bandejas com regas periódicas. Após este período as plântulas foram transplantadas para vasos de 10 litros contendo latossolo vermelho esterelizado.

A disposição dos vasos na casa de vegetação obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado. Para cada cultivar foram transplantadas 18 plantas divididas em dois tratamentos (plantas com irrigação e sem irrigação) em três repetições.

4.2 Coleta das amostras

Após 56 dias de cultivo na casa de vegetação, iniciou-se a supressão de irrigação para a coleta das folhas das plântulas dos cultivares de cana-de-açúcar. Foram coletadas as plantas submetidas à supressão de rega, e as plantas controle, que continuaram sob irrigação diária. As amostras foram coletadas nos primeiros dias de estresse hídrico sendo a primeira coletada no primeiro dia, após 24 horas de supressão da irrigação (T1). Foram coletadas seis amostras de cada cultivar, totalizando 12 amostras/amostragem. O segundo ponto de coleta compreende 72 horas de tratamento experimental (T2) e o terceiro ponto compreende 120 horas (T3).

As amostras foram congeladas, imediatamente, em nitrogênio líquido e depois armazenadas em ultrafreezer (-80°C).

4.3 Extração de DNA Plasmidial

Dois clones provenientes do projeto SUCEST que apresentaram expressão diferencial em membranas de macroarranjo foram adquiridos no banco de clones do BCCCenter. O primeiro representado por uma EST de 537 bases é originário de biblioteca de flor (SCRLFL4102C07), e outro contendo 614 bases oriundo de biblioteca de tecidos infectados *in vitro* por *Gluconacetobacter diazotrophicans* (SCSGAD1007F11). Os clones foram cultivados em 3 ml de meio de cultura CG (Circle Grow - Qbiogene) com antibiótico, por 12 horas à 37°C com agitação. Para extração de DNA plasmidial utilizou-se o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Neste processo 10 ml de cada amostra foi centrifugado. O sobrenadante foi descartado e ressuspensionado em 250 µl de solução de ressuspensão. Posteriormente foram adicionados 250 µl de solução de lise e os reagentes foram misturados por inversão 4 vezes. Incubou-se as amostras por 5 minutos a temperatura ambiente e adicionou-se 350 µl de solução de neutralização. O reagente foi misturado por inversão 4 vezes e centrifugada a velocidade de 10.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras, após a centrifugação foram colocadas numa coluna de “spin”, com filtro, suportado por um tubo de coleta e centrifugadas a 10.000 x g por 1 minuto. O material colhido no tubo foi descartado e a coluna reinserida no tubo de coleta. Posteriormente foram adicionados 750 µl de solução de lavagem na coluna, a qual foi e centrifugada novamente por 1 minuto. Repetiu-se o processo de lavagem novamente e, então, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml, onde foram adicionados 100 µl de água livre de nuclease e centrifugada a 10.000 x g por 1 minuto. A coluna foi então removida e as amostras coletadas no tubo foram estocadas a – 20°C. O tamanho real dos clones foi determinado por amplificação via PCR, com a utilização de iniciadores T7 e Sp6,

específicos para o vetor de clonagem pSPORT1 (Invitrogen). As condições de PCR utilizadas foram as seguintes: 95°C por 2 minutos, seguido por ciclos de 95°C por 45 s, 50°C por 45 s e 72°C por 45 s por 40 ciclos.

4.4 Sequenciamento do cDNA

4.4.1 Reação de PCR

Os dois clones, que apresentaram expressão diferencial em experimentos de macroarranjo, foram seqüenciados. O seqüenciamento total dos clones foi realizado em seqüenciador automático ABI PRISM 3100 DNA Sequencer, utilizando o modo de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo. Para cada amostra seqüenciada foram utilizados aproximadamente 500 ng de DNA (1 a 2 µl), 1 µl de “Big Dye” (DNA Sequencing Kit, ABI Prism), 3 µl de tampão de diluição (200 mM Tris HCl pH 9.0, 5 mM Cloreto de magnésio) e água milliQ estéril, para completar o volume final de 10 µl. Baseados nas seqüências das extremidades 5’ e 3’ dos clones foram desenhados iniciadores que permitiram a continuação do seqüenciamento total dos cDNAs dos mesmos. No seqüenciamento foram utilizados 1 µl dos iniciadores originários do vetor pSPORT1 (T7 e SP6) e mais dois iniciadores para cada EST (STPS1-A/STPS1-B e STPS2-A/STPS2-B), todos na concentração de 5 pmoles/µl. As condições de PCR utilizadas foram: 95°C por 2 minutos, seguido por ciclos de 95°C por 45 s, 50°C por 30 s e 60°C por 4 minutos num total de 35 ciclos.

4.4.2 Precipitação da reação de seqüenciamento

Nesta fase foram adicionados 80 µl de isopropanol (75%) às amostras. Os tubos foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos e, logo após centrifugados a 1800 x g por 35 minutos. Posteriormente as amostras foram invertidas em papel absorvente. No próximo passo, foram adicionados 200 µl de

etanol 70% e os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos. Os tubos foram invertidos novamente em papel absorvente e deixados secando 1 hora a temperatura ambiente. Após a precipitação as amostras foram ressuspensas em 10 µl formamida Hi-Di (Applied Biosystem) e desnaturadas por 5 minutos a 95°C. A placa contendo as amostras foi colocada no seqüenciador para a corrida eletroforética. O processo durou em torno de 15 horas e a leitura das bases foi realizada pelo programa ABI 3100 Data Collection.

4.5 Bioinformática

A união dos fragmentos de seqüências de nucleotídeos, provenientes dos sequenciamentos dos cDNAs estudados, foi realizada com o auxílio do programa CAP (Contig Assembly Program) que usa um algoritmo dinâmico para computar o máximo alinhamento por sobreposição entre dois fragmentos (HUANG 1992). As seqüências de nucleotídeos completas, obtidas pelo uso do programa CAP, foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados do NCBI através da ferramenta BLASTX (Altschul et al. 1990). A tradução conceitual e a busca por domínios conservados das ESTs foram realizadas, respectivamente, com as ferramentas ORF-Finder (ROMBEI et al. 2002) e CD Search (MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2004) do NCBI. A análise de alinhamentos múltiplos foi realizada com seqüências de proteínas TPS, publicamente disponíveis, com o auxílio do programa CLUSTAL W (THOMPSON et al.1994) e os dendrogramas foram construídas com ajuda do método de agrupamento “Neighbour Joinig” (SAITOU; NEI 1987).

4.6 Expressão *in silico*

A obtenção das seqüências dos genes para a expressão *in silico*, foi realizada por meio da busca com palavra chave das ESTs relacionadas a TPS no banco de dados do projeto SUCEST (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br>). As seqüências de

nucleotídeos dos ESTs selecionadas foram utilizadas para busca de similaridade com seqüências de aminoácidos do banco de dados do NCBI, através da ferramenta BLASTX. As ESTs com similaridades mais representativas (e-values < e-30) com o gene da TPS foram selecionadas para análises de expressão *in silico* através do levantamento do número de transcritos de TPS levando-se em conta o número de transcritos por biblioteca (frequência de transcritos por biblioteca).

4.7 Extração do RNA total

Para a extração do RNA total de folha de cana-de-açúcar foi utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) e o procedimento sugerido pelo fabricante que se baseia na metodologia descrita por CHOMCZYNSKI; SACCHI (1987). Os materiais utilizados na extrações foram tratados com água deionizada contendo dietil pirocarbonato (DEPC) (0.01% v/v) e esterelizados por duas horas a 180°C, com o intuito de evitar a presença de RNases (SAMBROOK et al. 1989)

As extrações de RNA total com amostras de folhas de cana-de-açúcar dos cultivares SP90-1638 (sensível) e SP83-2847 (tolerante). Para cada amostra de folha foram utilizados 1,2 g de tecido foliar. O tecido foi macerado em nitrogênio líquido até sua pulverização e, posteriormente, homogeneizado em 8,0 ml de reagente TRIZOL. Após serem incubadas por 5 minuto a temperatura ambiente, adicionou-se às amostras 1,6 ml de clorofórmio. A mistura, então, foi agitada vigorosamente e incubada por 3 minutos.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos a temperatura de 4°C. Após a centrifugação, a fase superior foi recuperada e transferida para tubos estéreis de 1,5ml. Para cada 900 µl de amostra foram acrescentados 540 µl de álcool isopropílico. Para a precipitação do RNA a solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente

Posteriormente foi realizada uma nova centrifugação por 10 minutos a 12.000 x g a 4°C, e após o descarte do sobrenadante, a amostra foi lavada com 1ml de álcool

etílico 75%. O precipitado foi então ressuspenso e centrifugado a 7.500 x g durante 5 minutos a 4°C. Foram realizadas mais duas lavagens e, então, o RNA total foi ressuspenso em água DEPC (livre de RNase) e armazenado a -80°C.

4.7.1 Quantificação do RNA total

O RNA total de cada amostra foi estimado e avaliado quanto ao grau de pureza em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific), onde 1,5 µl de cada amostra foi analisado. As medidas de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, cuja relação 260/280 fornece uma estimativa da pureza do ácido nucléico (SAMBROOK et al. 1989)

4.7.2 Análise da integridade do RNA total

Com o intuito de verificar a integridade das amostras de RNA, realizou-se uma eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,5% (p/v), (1,2 g de agarose; 8,0 ml de tampão de corrida 10X, composto de MOPS 20 mM pH 7.0, acetato de sódio 50 mM e EDTA 5mM; 65 ml de água tratada com DEPC; 6,4 ml de formaldeído), por 40 minutos a 77 V constante. O gel foi exposto a uma luz ultravioleta em transiluminador e sua imagem foi capturada por uma camera Kodak Edas 120.

4.8 Preparo do cDNA

As amostras de RNA extraídas foram tratadas com DNase I (kit Invitrogen) para evitar contaminação de DNA nas análises posteriores. Para tal tratamento foram adicionados a um tubo de 0,5 ml: 1 µg de RNA; 1µl de tampão de reação de DNase I (10x); 1 µl de DNase I 1U/µl e 10 µl de água tratada com DEPC. Incubou-se a mistura por 15 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, inativou-se a

DNase I através da adição de 1 µl de EDTA 25 mM e aquecimento por 10 minutos a 65°C.

No processo de preparo do cDNA foi utilizado o kit da enzima SuperScript III (Invitrogen). Para a transcrição reversa foram adicionados a um tubo de microcentrifuga, os seguintes reagentes: 1 µl de oligo(dT)₁₂₋₁₈; 1 µg de RNA (11 µl advindos do tratamento com DNase I) e 1 µl de mix de 10 mM de dNTP. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e em seguida incubada em gelo por 1 minuto. Posteriormente adicionou-se a mistura 4 µl de tampão First-Strand (5X); 1 µl de DTT 0,1 M; 1 µl de RNase OUT (inibidor de RNase) e 1 µl de SuperScript III RT (200 unidades/ µl). A mistura foi incubada por 60 minutos a 50°C e a reação inativada aquecendo as amostras por mais 15 minutos a 70°C. As amostras de cDNA prontas foram armazenadas a -80°C.

4.9 Reação de RT-PCR semiquantitativo

As análises de RT-PCR semiquantitativo foram realizadas com pares de iniciadores específicos (STPS1-F/ STPS1-R e STPS2-F/STPS2-R) construídos a partir das seqüências obtidas neste trabalho. Um par de iniciadores também foi utilizado para o gene da actina da cana-de-açúcar, que foi utilizado como controle interno das amostras e testadas em experimentos separados. A reação de PCR para as amostras foi realizado em tubos de 0,5 ml numa reação que continha: 1 µl de cada iniciador, 2 µl de cDNA, 2,5 µl de tampão para PCR 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 500 mM KCl), 2 µl de MgCl₂ (50 mM) e 0.4 µl de *Taq* DNA Polimerase. A mistura foi completada com água milliQ para 25 µl de volume final. A reação de PCR foi realizada em termociclador utilizando-se 26 ciclos para os genes estudados e 27 ciclos para a actina e as seguintes condições de PCR foram utilizadas para todos: 95°C por 2 minutos, seguido por ciclos apropriados de 95°C por 45 s, 55°C por 45 s e 72°C por 45 s e uma fase final de 72°C por 5 minutos. As amostras obtidas no PCR foram corridas em gel de agarose 1,6% (p/v) com tampão TBE (Tris, 0,89 M; EDTA,

0,02 M; Acido bórico, 0,89 M e água destilada) por 90 minutos a 80 volts. Os géis foram fotografados com a ajuda do fotodocumentador Kodak Edas 120 e os géis foram analisados com auxílio do programa Kodak 1D 3.5. As intensidades das bandas nos géis de agarose foram medidas e o nível de expressão foi calculado pela divisão da intensidade das bandas dos genes estudados pela intensidade do gene controle (actina).

V. RESULTADOS

5.1 Extração de DNA plasmidial

Para a realização do sequenciamento o DNA plasmidial foi extraído dos dois clones estudados neste trabalho (SCRLFL4102C07 e SCSGAD1007F11). Com o intuito de conhecer o tamanho da seqüência clonada, o cDNA alvo foi amplificado a partir das seqüências T7 e SP6, presentes no vetor pSPORT1, que flanqueiam a região representativa do RNA de cana-de-açúcar. O resultado foi a obtenção de duas seqüências de cDNA com aproximadamente 2000 pares de base cada (Figura 2).

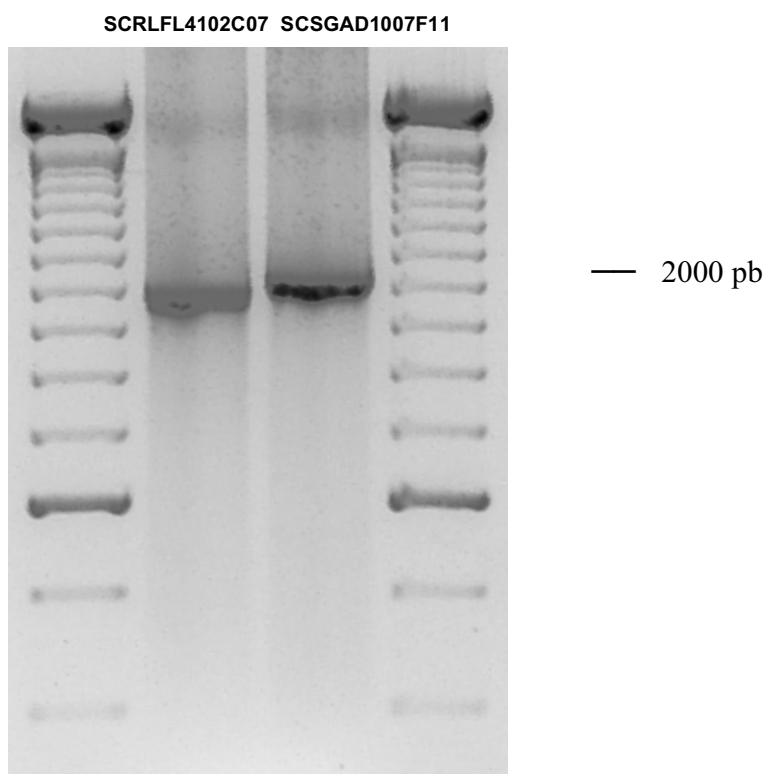


Figura 2. Eletroforograma evidenciando os produtos amplificados a partir dos cDNAs dos clones SCRLFL4102C07 e SCSGAD1007F11 em gel de agarose 1%.

5.2 Extração do RNA

As cultivares de cana-de-açúcar (SP 83-2847 e SP 90-1638) foram cultivadas em casa de vegetação e submetidas a déficit hídrico para coleta de tecido foliar. O RNA extraído das folhas foi quantificado por espectrofotometria e a razão obtida entre as leituras dos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm ficou entre o esperado para amostras de RNA: entre 1.8 e 2.0. As Figuras 3 e 4 apresentam géis de agarose 1,5% onde foram testadas as integridades dos RNAs extraídos.

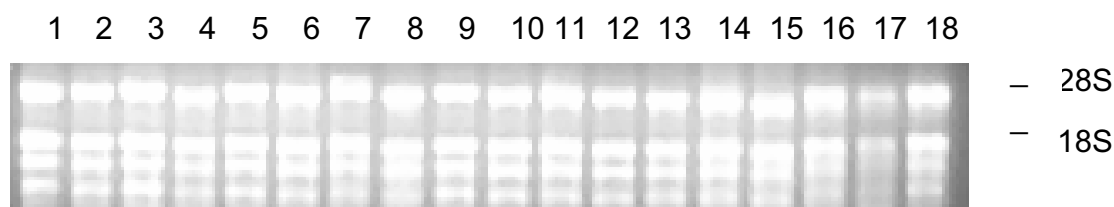


Figura 3. Eletroforese em gel desnaturante de agarose 1.5% (TBE 1x). As 18 amostras da cultivar 1638 (sensível) utilizadas no experimento foram testadas quanto a sua integridade. As bandas correspondentes aos RNAs ribossomais estão indicadas na figura.

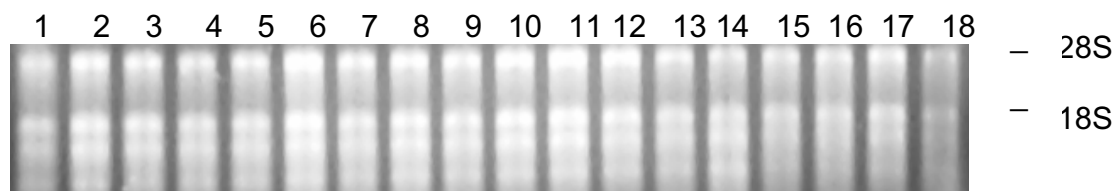


Figura 4. Eletroforese em gel desnaturante de agarose 1.5% (TBE 1x). As 18 amostras da cultivar 2847 (tolerante) utilizadas no experimento foram testadas quanto a sua integridade. As bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S estão indicadas na figura.

As amostras de RNA total extraídas foram utilizadas nos testes utilizando a metodologia do RT-PCR semiquantitativo. As Figuras 5 e 6 representam as imagens digitalizadas das amostras resultantes do teste de RT-PCR com iniciadores específicos para o gene STPS2 e para o gene da actina (controle) na variedade sensível de cana-de-açúcar (1638).

T1C1 T1E1 T1C2 T1E2 T1C3 T1E3 T2C1 T2E1 T2C2 T2E2 T2C3 T2E3 T3C1 T3E1 T3C2 T3E2 T3C3 T3E3



Figura 5. Eletroforograma em gel de agarose 1.6 % (tampão TBE 1x) com o resultado da amplificação por RT-PCR do gene STPS2 em amostras foliares da variedade sensível de cana-de-açúcar nos três tempos estudados com três repetições. T = tempo; C = planta controle e E = planta sobre estresse hídrico.

T1C1 T1E1 T1C2 T1E2 T1C3 T1E3 T2C1 T2E1 T2C2 T2E2 T2C3 T2E3 T3C1 T3E1 T3C2 T3E2 T3C3 T3E3

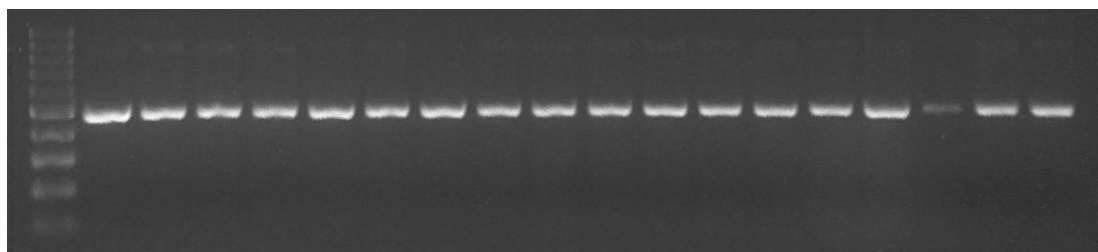


Figura 6. Eletroforograma em gel de agarose 1.6 % (tampão TBE 1x) com o resultado da amplificação por RT-PCR do gene actina (controle) em amostras foliares da variedade sensível de cana-de-açúcar nos três tempos estudados com três repetições. T = tempo; C = planta controle e E = planta sobre estresse hídrico.

5.3 Identificação e dedução da sequência de aminoácidos das ESTs

A identificação das seqüências foi realizada por seqüenciamento completo dos clones utilizando iniciadores específicos (Tabela 2.). Os iniciadores foram desenhados baseados na seqüência previamente determinada dos ESTs de *Saccharum* spp provenientes do projeto SUCEST, originalmente com 537 pb (iniciadores STPS1-A e STPS1-B) e outro com 614 pb (iniciadores STPS2-A e STPS2-B).

Tabela 2. Iniciadores usados no sequenciamento (*) e RT-PCR dos genes STPS1 e STPS2

Nome	Seqüência (5' → 3')	Genes	Orientação	Posição
STPS1-A*	AGATGGGATGAACCTTGT	TPS	5' → 3'	255-272
STPS1-B*	GGAGTTACAAAGGGTGCT	TPS	5' → 3'	1147-1164
STPS2-A*	ACCACCCTAAATCCAAAC	TPS	3' → 5'	216-233
STPS2-B*	ATCTTTAGCCCTGCTGTC	TPS	3' → 5'	1264-1281
STPS1-F	GTGCCAACAAGAACTGACG	TPS	5' → 3'	64-82
STPS1-R	TGTGCCTGTGTCGTTTCTC	TPS	3' → 5'	445-463
STPS2-F	GTGGACGAGAGATGAAGGG	TPS	5' → 3'	519-537
STPS2-R	AGCCAAGTCATCCTCCAAC	TPS	3' → 5'	1080-1098
actina-F	ACAATGGCACAGGAATGG	<i>Actina</i>	5' → 3'	38-55
actina-R	AGCATAGAGGGGAGAGCAC	<i>Actina</i>	3' → 5'	421-438

As seqüências obtidas foram alinhadas por sobreposição com ajuda do algoritmo CAP gerando duas seqüências consenso, uma com 1876 pb (STPS1) e outra com 1822 pb (STPS2), representando estas as seqüência dos clones de cDNA estudados. As seqüências, STPS1 e STPS2, foram submetidas ao banco de dados do NCBI onde receberam respectivamente os seguintes números de acesso: (EU761244 e EU761245). Com auxílio da ferramenta BLASTX foi comprovada a similaridade de seqüência entre os cDNAs estudados e os genes da trealose-6-fosfato sintase (TPS). As seqüências completas das TPSs, encontradas no banco de genes do NCBI, apresentam tamanho médio de 3000 nucleotídeos, sendo assim, os genes estudados neste trabalho caracterizam-se como fragmentos de TPS. Para o fragmento do gene STPS1 foram encontradas similaridades significativas com uma provável TPS de arroz, a AtTPS1 de *A. thaliana*, a TPS1 de tomate e uma provável TPS de banana com as respectivas porcentagens de similaridade: 92, 81, 82 e 80% (Tabela 3.). Para o fragmento do gene STPS2 foram encontradas similaridades significativas com uma provável TPS de arroz, uma provável TPS de batata, a AtTPS7 de *A. thaliana* e uma TPS de uma espécie de orquídea (*C. parviflorum*) com 90, 83, 80, 79% de similaridade, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 3. Similaridade do gene TPS1 de cana de açúcar com TPSs de outros organismos

Proteína	Organismo	GenBank No.	Identidade%	Similaridade %	E-value
putative TPS	<i>O. sativa</i>	AAU44253	89	92	0.0
ATTPS1	<i>A. thaliana</i>	AAD30578	73	81	0.0
TPS1	<i>S. lycopersicum</i>	ABO61742	74	82	0.0
putative TPS	<i>M. balbisiana</i>	ABF70084	72	80	0.0

Tabela 4. Similaridade do gene TPS1 de cana de açúcar com TPSs de outros organismos

Proteína	Organismo	GenBank No.	Identidade%	Similaridade %	E-value
putative TPS	<i>O. sativa</i>	AAT01318	83	90	0.0
putative TPS	<i>S. tuberosum</i>	AAL91978	69	83	3,00E-141
ATTPS7	<i>A. thaliana</i>	AAF82169	68	80	2,00E-138
TPS	<i>C. parviflorum</i>	AAN86570	65	79	4,00E-138

Além da similaridade a porcentagem de identidade entre as seqüências apresentou valores consideravelmente altos que, aliados a baixos valores de e-value permitem a confiabilidade nos resultados do BLASTX para as seqüências estudadas (Tabelas 3 e 4). Com a ajuda da ferramenta ORF Finder foi possível deduzir a seqüência de aminoácidos de STPS1 e STPS2 que apresentam, respectivamente, 470 e 368 aminoácidos (Figura 7 e 8).

```

262 atgaacctgtgagctatgagtagctgcatgccaaagggtctaagaaggagttctgatacttagtgagtttctggggcagcaccaatca
M N L V S Y E Y V A C Q G S K K G V L I L S E F A G A A Q S
352 cttggagctggcgccattctagtaaaccttgggaattattacagaagggtgcagactcaatacggcatgctttaacgatgccatccgatgag
L G A G A I L V N P W N I T E G A D S I R H A L T M P S D E
442 agagagaaacgcacaggcacaaactatgctcatgtcacaactcacacggctcaagattgggctgaaacttttgtatttgagctaaatgac
R E K R H R H N Y A H V T T H T A Q D W A E T F V F E L N D
532 acggttgctgaggcactactgaggacaagacaagtcctctcctggtcttcctagtcaaatggcaatccagcaatatttgcgctctaaaaat
T V A E A L L R T R Q V P P G L P S Q M A I Q Q Y L R S K N
622 cgtctgctcatattgggtttcaattcaacattgactgagccagtcgaatcctctgggagaagggtgggtgaccaaatacaaggaaatggaa
R L L I L G F N S T L T E P V E S S G R R G G D Q I K E M E
712 ctcaagttgcatcctgacttaagggtcctctgagagccctctgtgaggatgagcacactacagttattgttctcagtgaggcagtgacagg
L K L H P D L K G P L R A L C E D E H T T V I V L S G S D R
802 agtgttcttgatgaaaattttggagaattttaaaatgtggttggcgagagcatgggatgtttttacgcccgacttacggagaatggatg
S V L D E N F G E F K M W L A A E H G M F L R P T Y G E W M
892 acaacaatgctgagcatctgaacatggattgggttgacagcgttaaagcatgttttgaatactttacagaaagaaccccaagatcccat
T T M P E H L N M D W V D S V K H V F E Y F T E R P R S H
982 ttcaacatcgtgaacatcatttgtgtggaactacaagtagctgatgttgaatttgaaggctacaagcaagagatagctgcagcac
F E H R E D I Y V F F D P E Y P S E S K I K P E G G S A S L D
1072 ttgtggacaggtccgatctcaaatgcagctgttgatgttgttcaaggagtcggtcagttgaagttcggtctgttggagttacaagggt
L W T G P I I S N A A V D V V Q G S R S V E V R S V G V T K G
1162 gctgcaattgatctattttaggggagatattcacagcgaaaacatggttactccaattgactatgtcctgtgtataggctatttctt
A A I D R I L G E I F H S E N M V T P I D Y V L C I G H F L
1252 ggggaaggatgaggacatctatgtctttttgatcccgagtagccttctgaatccaaaataaaacagagggtgggtcagcttcacttgac
G K D E D I Y V F F D P E Y P S E S K I K P E G G S A S L D
1342 cggagggcgaacggaagggtcaccatcgaatggcaggagcagctccaggaacccacagtcaggagacacagaaggcgagcaggtcgtcc
R R P N G R S P S N G R S R N P Q S R T Q K A Q Q A S
1432 gagaggtcatctcatcaagccacagcagcgcaagcagcaaccagcactggcggaagggtcctcggtccttgatctcaaggcgagaaac
E R S S S S S H S S S A S S N H D W R E G S S V L D L K G E N
1522 tacttctcctgcgcgtcggaaggaagcgggtccaacgcccgttacctgctgagttcgtcgaggaggttgtctcttctcaagggaattg
Y F S C A V G R K R S N A R Y L S S S E E V V S F L K E L
1612 gcatcggaacagctggttccaatccagctgtggtgattacatgttcatggataggcagtaa 1674
A S A T A G F Q S S C A D Y M F M D R Q *

```

Figura 7. Provável sequência de aminoácidos gerados pela tradução da sequência incompleta do gene STPS1. O M em azul representa o aminoácido metionina e o asterisco em vermelho o códon de parada.

```

64 atgtcggaacaagaaaacgagctgagggcatggaaaacattaccgctatgtcagcacccatgatgttgcatttgggtcaaagagctttgtc
M S E Q E K Q L R H G K H Y R Y V S T H D V A Y W S K S F V
154 caggatctggagagggtctgcaaggatcacttttaggaagccatgctggggtataggactagggtttggatttaggttggcgctagac
Q D L E R A C K D H F R K P C W G I G L G F G F R V V A L D
244 ccacatttcacaaagcttaattctggatacaatcatcatgtcttacgagagagcaagagtaggggtcatattacttgattgatgggtaca
P H F T K L N L D T I I M S Y E R A K S R V I L L D Y D G T
334 ttggtaccacagacttcaatcgataagaacaaagttcagaaaatttgagaatcatcaataccttatgttcggatagcaataacactggt
L V P Q T S I D K K P S S E I L R I I N T L C S D S N N T V
424 ttcatgtcagtgaggagaagtagggatagcttgggatcattgtttgcatcatgccaaagctaggaattgcagcagaaacacgggtacttc
F I V S G R S R D S L G S L F A S C P K L G I A A E H G Y F
514 ttaagggtgacgagagatgaagggtggcaatcgagcacccatacctcagactttggatggatgcaaatggcgagccagtgatgaattct
L R W T R D E G W Q S S T H T S D F G W M Q M A E P V M N L
604 tatacagaatcaactgatggatcctatattgagaccaaaagaaactgctttggatggcatcatcaggatgctgaccaggcctttgggtct
Y T E S T D G S Y I E T K E T A L V W H H Q D A D P G F G S
694 acccaggccaaggagatgctggatcacctggaaagttagctagcaaatgaaccagtcgcagtgaaagagtgccagttcattgtcgaagtt
T Q A K E M L D H L E S V L A N E P V A V K S G Q F I V E V
784 aaacctcagggtgttagcaagggtctttagctgagaagatacttacattgatgaaggagaaaggcgagcaagcagattttgtattatgc
K P Q G V S K G L V A E K I L T L M K E K G Q Q A D F V L C
874 atcggatgatgacaggtcagatgaggacatgtttgaaaatatcgctgatgtcattaaagagaaacgttgttgcctcaaaagacaccactatt
I G D D R S D E D M F E N I A D V I K R N V V A P K T P L F
964 gcatgtacagtgaggcgagaaaccgagcaaaagccaggttctacctggatgatacacttgaagtaggtaatatgctgagcttgcagcagat
A C T V G Q K P S K A R F Y L D D T L E V G N M L S L L A D
1054 gcttcggaacctgtgaatagagttggaggatgacttggctacatctgtctcagccatagatatcagcagatgaaccaccacagct
A S E P D P V I E L E D D L A T S V S A I D I S D E P P Q L
1144 ggtcatagaagggaaggatcttag 1170
G H R R E E G S *

```

Figura 8. Provável sequência de aminoácidos gerados pela tradução da sequência incompleta do gene STPS2. O M em azul representa o aminoácido metionina e o asterisco em vermelho o códon de parada.

5.4 Domínios Conservados e Dendrograma

Com ajuda do programa CLUSTALW foi possível fazer um alinhamento entre as TPSs de cana-de-açúcar e as seqüências dos genes (Tabelas 3 e 4). Pelo uso da ferramenta CDS do NCBI foi possível identificar nas seqüências STPS1 e STPS2 regiões altamente conservadas classificadas como os domínios TPS e TPP (Figura 9 e 10). A análise das seqüências permitiu observar que ambas apresentam a seqüência completa do domínio TPP e apenas parte da seqüência característica do domínio TPS. O domínio TPP, ubíquo em plantas, é a chave para a classificação das duas subfamílias proposta por Leyman et al. (2001) para genes TPS. Nossos estudos indicam que o domínio TPP da STPS1 assemelha-se aos domínios pertencentes à classe I das TPS, pois, não apresenta as regiões conhecidas como fosfatase “boxes” (Figura 9), enquanto que a seqüência do gene STPS2 apresentou as fosfatase “boxes” normalmente encontradas na classe II (Figura 10).

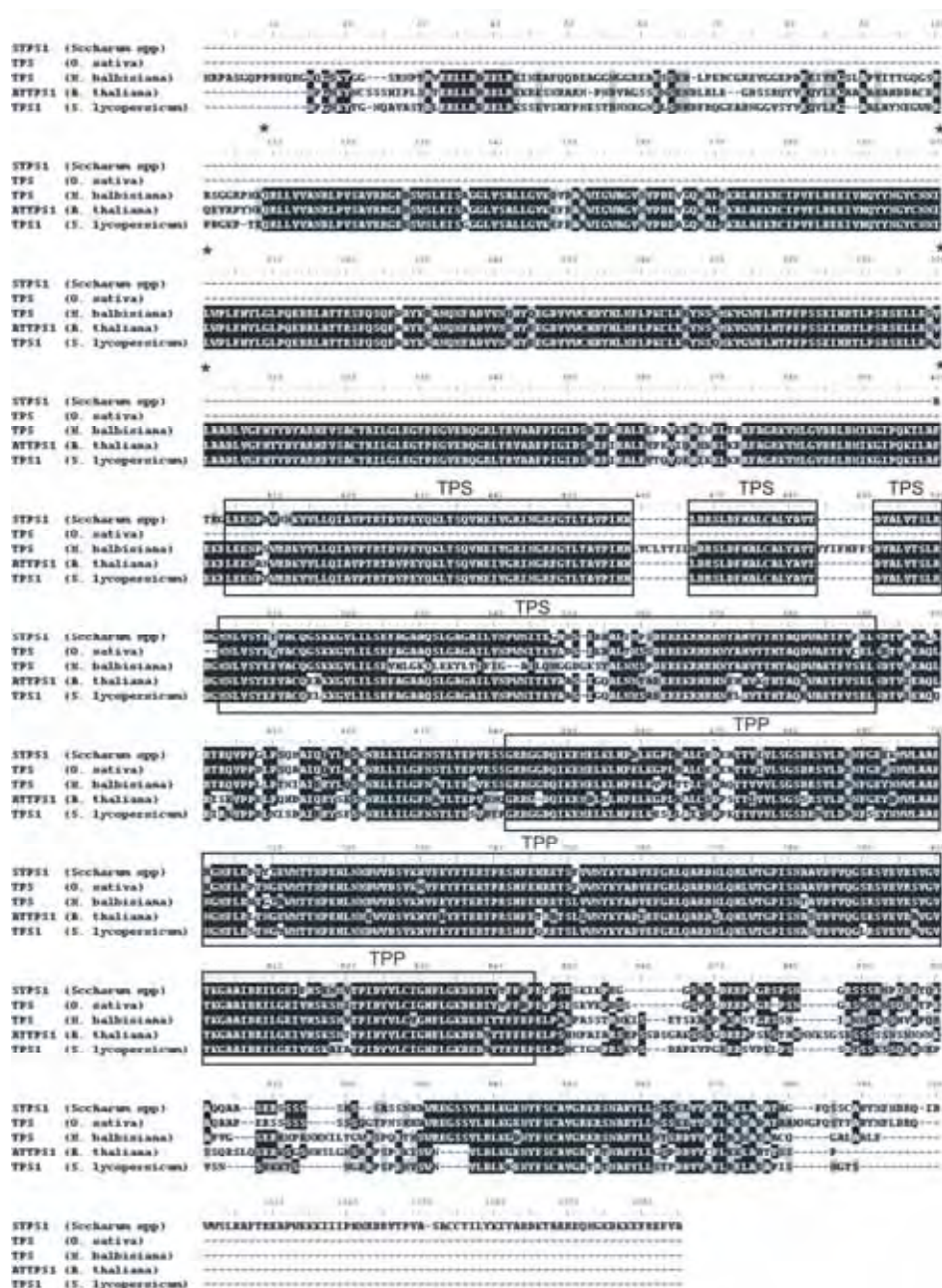


Figura 9. Domínios conservados, TPS (incompleta) e TPP (ausência de “boxes” fosfatase), em STPS1 comparados com os genes relacionados na Tabela 3. Regiões flanquadas por * representam a porção do domínio TPS ausente na sequência incompleta do STPS1 .

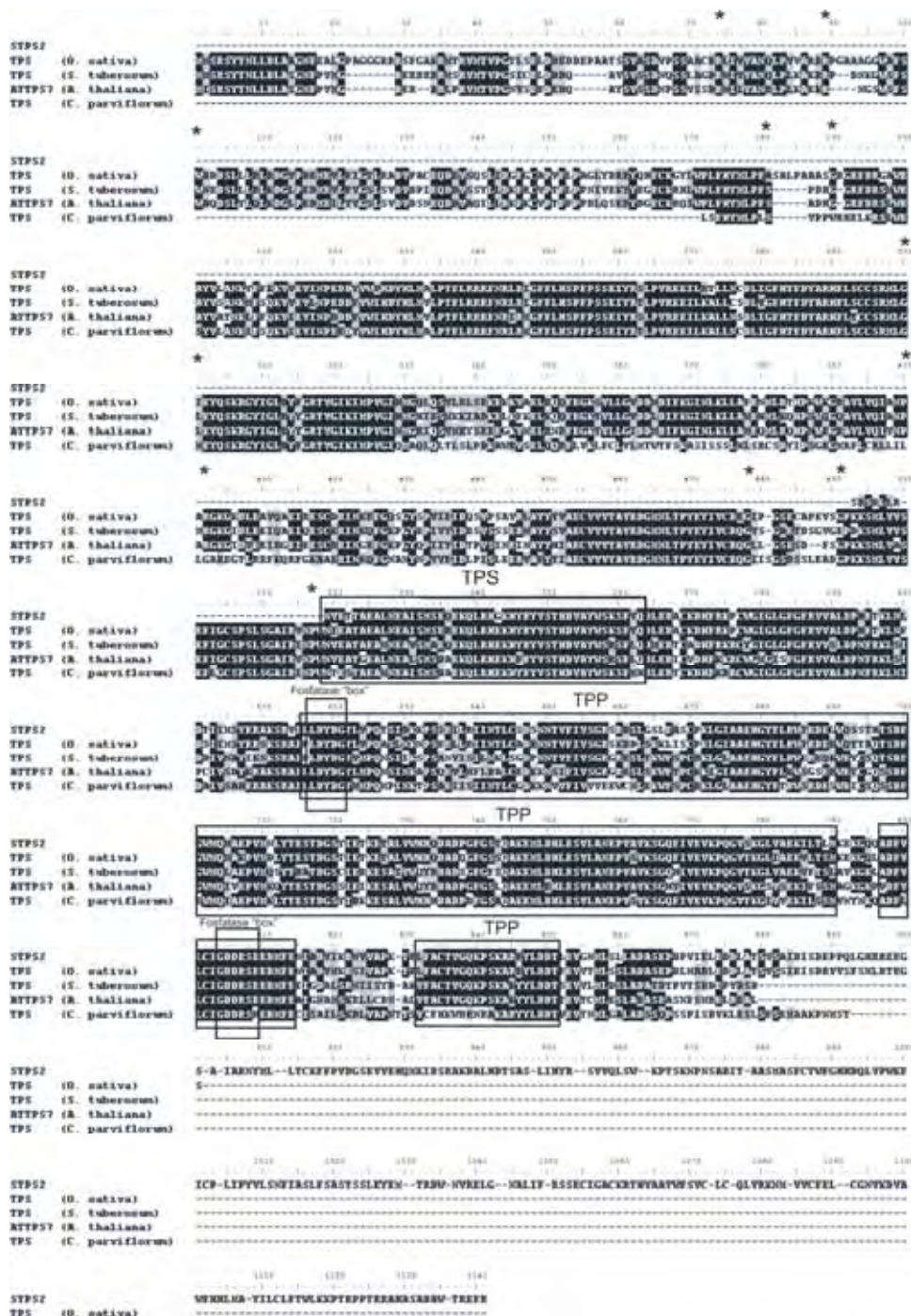


Figura 10. Domínios conservados, TPS (incompleta) e TPP (presença de “boxes” fosfatase), em STPS2 comparados aos genes relacionados na Tabela 4. Regiões flanqueadas por * representam a porção do domínio TPS ausente na sequência incompleta do STPS2.

Dois dendrogramas foram construídos utilizando os 11 genes de TPS identificados em *A. thaliana* e a sequência de nucleotídeos dos genes STPS1 e 2 de *Saccharum* spp através do método “Neighbor Joining” (Figura 11a e 11b), respectivamente. No primeiro dendrograma (Figura 11a) podemos verificar que STPS1 forma um grupo distinto, porém próximo dos genes caracterizados como classe I em *A. thaliana* (AtTPS1, 2, 3 e 4) enquanto que os representantes da classe II apresentam uma ampla distância de STPS1. No segundo (Figura 11b), o gene STPS2 formou um grupo com o genes de classe II (AtTPS5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) fato já esperado pela presença de “boxes” fosfatase nos domínios TPP do mesmo.

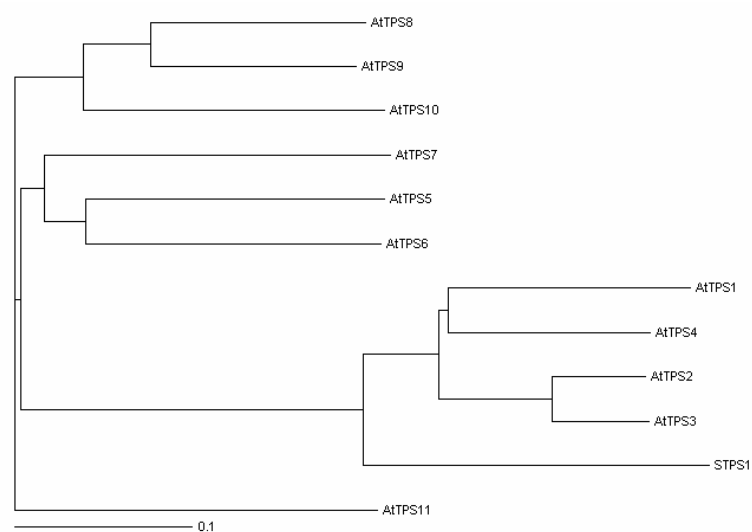
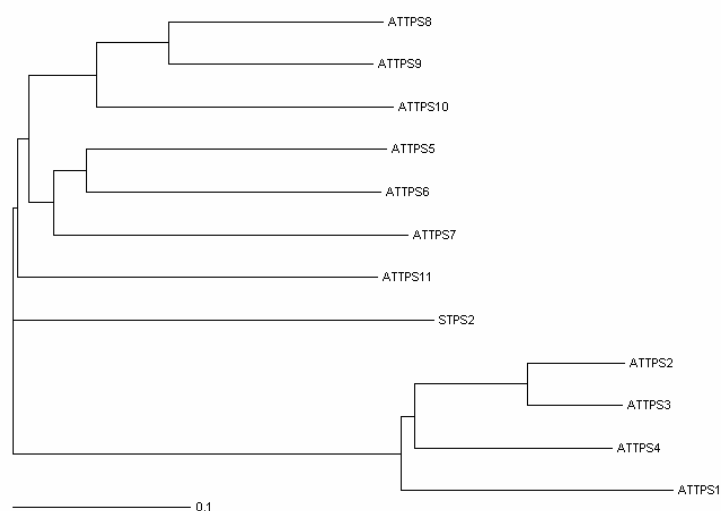
a**b**

Figura 11 a,b Dendrograma baseado no método “Neighbor Joining” (bootstrap x1000) entre a seqüências incompletas de TPS de cana-de-açúcar (STPS1 e STPS2) e os genes TPS de *A. thaliana*. **a** O gene TPS incompleto de cana-de-açúcar cultivada, STPS1, agrupando-se com genes da classe I de *A. thaliana*. **b** O gene TPS incompleto de cana-de-açúcar cultivada, STPS2, agrupando-se com genes da classe II de *A. thaliana*.

5.5 Expressão dos genes TPS

Dos 38 “clusters” de ESTs, relacionados a trealose, oriundos do projeto SUCEST foram selecionados 14, pois, não apresentavam alinhamento perfeito entre si (dados obtidos por alinhamento, CLUSTALX) porém, apresentavam alta similaridade com TPSs de outros organismos (e-values menores que e^{-30} no BLASTX). As ESTs selecionadas apresentaram, principalmente, similaridade com TPSs de arroz e Arabidopsis (Tabela 5.).

Tabela 5. ESTs relacionados ao gene TPS, oriundos do banco de dados do projeto SUCEST e sua semelhança com gene de outros organismos.

EST	BlastX	Organismo	GenBank	Ident. %	Simil. %	E-value
SCRLFL4102C07	ATTPS1	<i>A. thaliana</i>	Q9SYM4	86	90	6,00E-79
SCSGAD1007F11	Provável TPS	<i>O. sativa</i>	AAT01318	83	89	3,00E-99
SCCCCL3002E04	ATTPS6	<i>A. thaliana</i>	Q94AH8	61	77	0.0
SCBGLR1115H11	Provável TPS	<i>O. sativa</i>	ABF94728	82	89	0.0
SCEZHR1083A02	Provável TPS	<i>O. sativa</i>	BAD86973	87	92	0.0
SCCCLR1070E10	TPS	<i>G. hirsutum</i>	AAV65495	66	81	1,00E-173
SCCCCL4003E08	ATTPS10	<i>A. thaliana</i>	AAC24048	65	82	3,00E-151
SCCCCL2001H04	ATTPS9	<i>A. thaliana</i>	Q9LRA7	61	77	8,00E-126
SCEZRZ1015H08	Provável TPS	<i>O. sativa</i>	BAD86973	86	91	2,00E-131
SCEPCL6021E07	Provável TPS	<i>O. sativa</i>	BAD09487	71	82	3,00E-120
SCAGCL6016B11	ATTPS10	<i>A. thaliana</i>	AAC24048	60	79	2,00E-65
SCVPCL6064B03	Provável TPS	<i>O. sativa</i>	BAF12169	70	79	7,00E-59
SCMCRT2088E01	Provável TPS	<i>O. sativa</i>	BAD19111	84	87	3,00E-62
SCBFRT1064F09	Provável TPS	<i>O. sativa</i>	BAC99712	57	71	3,00E-23

Estes 14 “clusters” representam os 110 transcritos de TPS isolados de bibliotecas do projeto SUCEST, feitas a partir de tecidos e tratamentos distintos (Figura 12). A maioria dos transcritos para a TPS apresentaram frequências similares (variando de $2,47 \times 10^{-4}$ a $5,14 \times 10^{-4}$) na maioria das bibliotecas estudadas, exceto pelas bibliotecas CL, AD, RZ, e LV que apresentaram as maiores frequências ($29,00 \times 10^{-4}$, $6,80 \times 10^{-4}$, $6,76 \times 10^{-4}$, $6,58 \times 10^{-4}$ respectivamente).

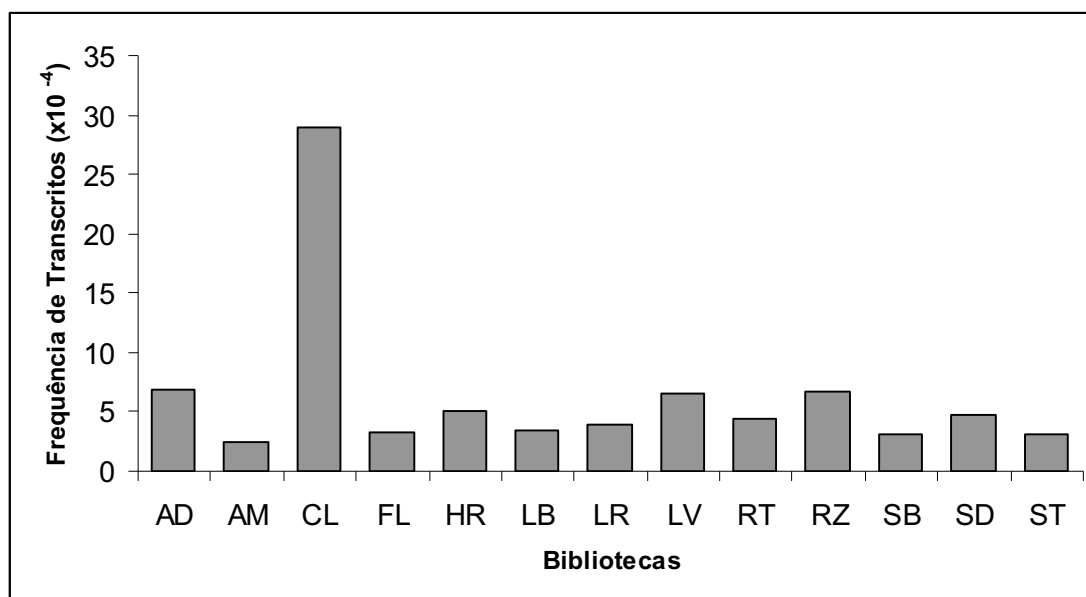


Figura 12. Expressão *in silico* de ESTs de TPS em cana-de-açúcar em relação as diferentes bibliotecas construídas no projeto SUCEST. As bibliotecas são: AD (mistura da zona de crescimento, caule e meristema apical de plantas cultivadas *in vitro* e infectadas com *Gluconacetobacter diazotrophicans*); AM (meristema apical de plantas jovens); CL (calo tratado por 12h a 4°C e 37°C); FL (flores colhidas em diferentes estágios de desenvolvimento); HR (mistura de tecidos de transição entre raiz e zona de crescimento, caule, meristema apical de plantas cultivadas *in vitro* e infectadas com *Herbaspirillum diazotrophicans*); LB (gema lateral de plantas maduras); LR (cartucho da folha de plantas imaturas); LV (folhas estioladas de plântulas cultivadas *in vitro*); RT (raízes de 0,3 cm de plantas maduras e ápice da raiz); RZ (região de transição entre raiz e caule de plantas jovens); SB (casca de cana madura); SD (sementes em desenvolvimento); ST (primeiro e quarto internódio de plantas imaturas).

Foram realizadas análises por RT-PCR semiquantitativo para comprovar indícios de expressão diferencial dos genes STPS1 e STPS2, em membranas de macroarranjo realizadas em cana-de-açúcar sobre estresse hídrico. A amplificação foi realizada com iniciadores específicos para os dois genes e com o controle interno, gene da actina (Tabela 2) que serviu para a padronização dos dados. Apesar de oriundos de ESTs de outras bibliotecas (FL e AD), os genes STPS1 e STPS2 respectivamente, apresentaram expressão nas folhas das plantas controle e sob estresse das duas cultivares de cana-de-açúcar estudadas. O gene STPS1 parece manter seu nível de expressão próximo ou superior ao do controle na planta tolerante sob estresse hídrico exceto pelo T2 (72 h), já para a planta sensível, o STPS1 mostra

uma tendência à repressão sob estresse hídrico para os três tempos estudados (Figura 13). A expressão do gene STPS2 não apresenta diferenças significativas na relação entre as plantas controle e sob estresse para ambas as cultivares estudadas, exceto pelo T2 que apresentou uma tendência à repressão sob estresse (Figura 14).

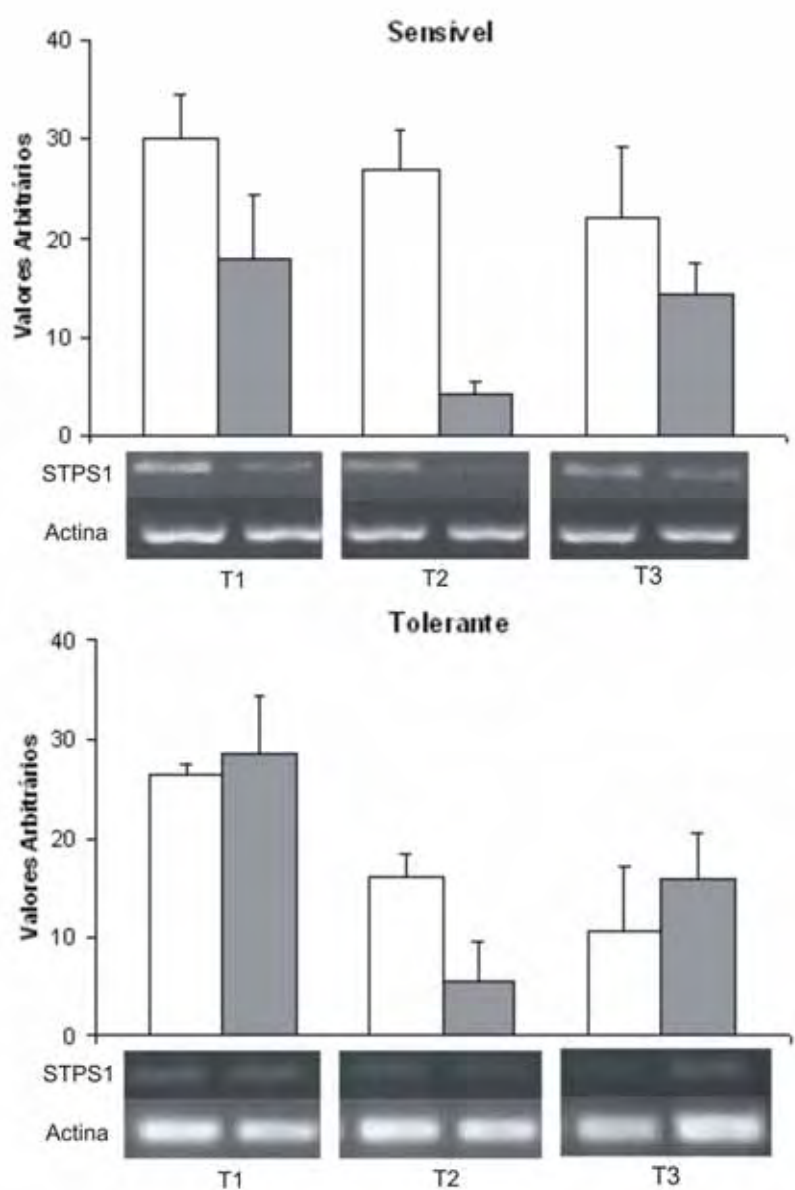


Figura 13. Cinética da expressão relativa do gene STPS1, em plantas controle (barras brancas) e sob estresse hídrico (barras cinzas), nas cultivares sensível e tolerante (três repetições cada tratamento). T1 = 24h; T2 = 72h; T3= 120h.

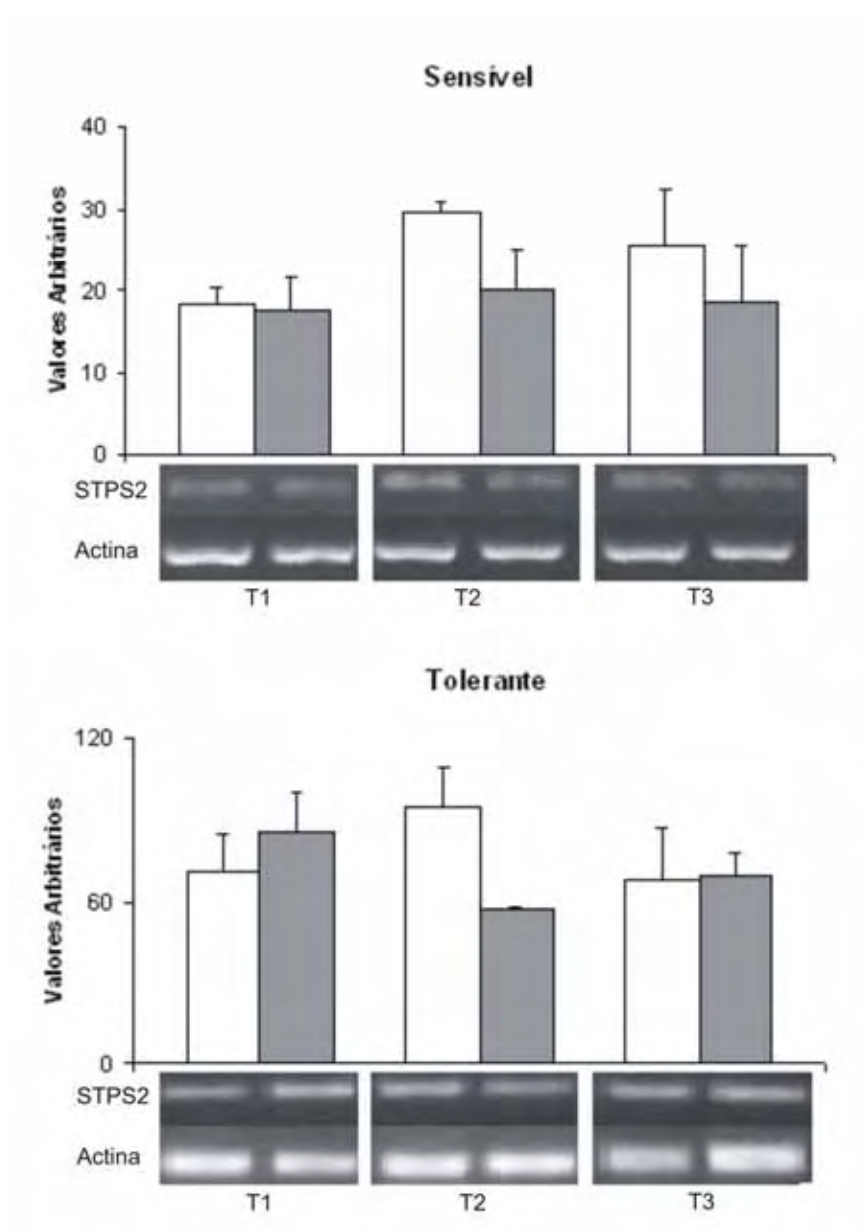


Figura 14. Cinética da expressão relativa do gene STPS2, em plantas controle (barras brancas) e sob estresse hídrico (barras cinzas), nas cultivares sensível e tolerante (três repetições cada tratamento). T1 = 24h; T2 = 72h; T3= 120h.

VI. DISCUSSÃO

6.1 Expressão *in silico* da TPS em cana-de-açúcar

Os 14 “clusters” identificados em cana de açúcar podem representar isoformas para o gene como já identificados em outros organismos. Esse provável alto número de isoformas de TPS em cana-de-açúcar, pode ser explicado pela poliploidia e pela condição de híbrido interespecífico associada à *Saccharum* spp. Assim como em cana-de-açúcar, também foram encontrados transcritos de genes TPS em vários tecidos vegetais em plantas como *Arabidopsis* e algodão (BLAZQUEZ et al. 1998; KOSMAS et al. 2006). Os resultados da expressão *in silico*, obtidos neste trabalho, indicam uma expressão constitutiva de TPS em diversos tecidos e tratamentos em cana-de-açúcar, o que corrobora com estudos de AVONCE et al. (2006) onde os genes AtTPS1, AtTPS6, AtTPS7 AtTPS8 e AtTPS11 apresentam expressão constitutiva em plantas de *Arabidopsis*. Um alto número de transcritos também foi encontrado em calos sobre estresse de temperatura, muito embora a literatura relate que, para a maioria dos vegetais superiores, o nível de trealose produzido não é suficiente para seu efeito osmoprotetor, estudos realizados com arroz (GARG et al. 2002; JANG et al. 2003) e tabaco (ALMEIDA et al. 2005), tem mostrado que a inclusão de genes de TPS exógeno aumenta a resistência ao estresse causado por baixas temperaturas.

6.2 Genes da TPS de *Saccharum* spp

Dois ESTs, selecionados por apresentarem expressão diferencial em membranas de macroarranjo, foram seqüenciados em sua totalidade, e contem respectivamente 1876 pb (STPS1) e 1822 pb (STPS2). Estes genes apresentam região C-terminal completa incluindo o domínio fosfatase (TPP) e um fragmento do

domínio da sintase (TPS). Esse dois domínios, diferentemente dos procariotos, estão fundidos nas TPS de eucariotos e foram primeiramente relatados por LEYMAN et al. (2001) em *A. thaliana*, que as classificou em duas classes que correspondem às enzimas que apresentam ou não as fosfatase “boxes” nos seus respectivos domínios TPP. Os domínios TPP apresentam então a chave para a classificação das TPS em plantas. O fragmento do gene STPS1 detectados inicialmente em bibliotecas de flores (FL) apresentou domínio fosfatase sem “boxes” fosfatase (Figura 9) e alta similaridade com AtTPS1 de *A. thaliana*. Segundo VAN DIJKEN et al. (2004), em plantas de *A. thaliana* mutantes, foram detectados maiores níveis de expressão relativa do gene AtTPS1 em órgãos metabolicamente ativos como nas gemas das flores e frutos. O gene AtTPS1, também foi capaz de restaurar o crescimento e a síntese de trealose em leveduras mutantes, e é reconhecidamente essencial para o desenvolvimento da planta e para a floração além de gerar como produto a T6P que é indispensável para o crescimento e utilização do carboidrato em *A. thaliana* (BLAZQUEZ et al 1998; SCHLUEPMANN et al 2003; DIJKEN et al 2004). O fragmento do gene STPS2 apresentou similaridade com AtTPS7 de *A. thaliana* que corresponde à segunda classe das TPS. Apesar da expressão constitutiva do gene AtTPS7, ele foi incapaz de complementar mutantes *tps1* e *tps2* de *S. cerevisiae*, além de não apresentar atividade TPS (VOGEL et al. 2001). Porém evidências indicam que genes de segunda classe controlam a morfologia da célula desempenhando papel importante nos fenótipos do desenvolvimento da planta (CHARY et al. 2008).

6.3 Expressão das TPSs em *Saccharum* spp

Os dados obtidos nas análises de RT-PCR semiquantitativo confirmaram que os dois genes de TPS são expressos constitutivamente em folhas jovens de cana-de-açúcar cultivada sob condições normais (Figura 13 e 14). A expressão constitutiva de TPS em cana-de-açúcar foi relatada também por BOSCH (2005) que constatou altos

níveis de expressão de um gene da trealose fosfato sintase, em internódios jovens (3 meses) em diversas variedades de cana-de-açúcar. O gene STPS1 apresentou-se diferencialmente expresso nas duas cultivares de cana-de-açúcar quando submetidas ao estresse hídrico (Figura 13). A indução do gene STPS1 em plantas tolerantes bem como a sua repressão em plantas sensíveis no início do estresse hídrico, de certa forma corrobora os estudos, ainda não publicados, de expressão diferencial utilizando membranas de macroarranjo de plantas sob estresse hídrico. Já foi mostrado que o aumento da expressão do gene da TPS1 e conseqüente acumulação de T6P atua sobre o metabolismo de crescimento e de regulação do açúcar em plantas de *A. thaliana* (SCHLUEPMANN et al 2003; DIJKEN et al 2004). Porém em cana-de-açúcar apesar da STPS1 indicar ter um papel no metabolismo, ainda não é claro se ele está ou não envolvido diretamente na tolerância ao estresse hídrico. Frente à dificuldade do melhoramento genético clássico em poliplóides como a cana-de-açúcar cultivada, o aumento na expressão de STPS1 em cultivares tolerantes sob estresse hídrico, aliada a similaridade deste com o gene AtTPS1, revela um potencial gene alvo no melhoramento genético e estudos de transgênia em cana-de-açúcar e outras espécies de plantas. Em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), plantas transgênicas, carregando o gene da TPS de um cogumelo *G. frondosa*, apresentaram aumento significativo na tolerância à seca (ZHANG et al. 2006). Segundo Almeida et al. (2005) plantas de tabaco modificadas para expressar o gene AtTPS1 promoveram resistência a diversos tipos de estresse abiótico incluindo estresse hídrico. Além disso, a superexpressão do gene AtTPS1 em *A. thaliana* gerou um aumento na produção de T6P, e desencadeou a formação de plantas com fenótipos insensíveis a açúcar e ABA e tolerantes à seca, devido provavelmente a um caráter sinalizador deste metabólito (AVONCE et al. 2004). Segundo Schluepmann et al. (2003, 2004) a T6P desempenha um papel de regulador na utilização de carboidrato e está ligada a expressão de genes de resposta a estresse nutricional, biótico e abiótico. Estudos realizados em tabaco, modificados por genes da síntese de trealose provenientes de *E. coli*, comprovaram que níveis aumentados de T6P em folhas tem importante papel na regulação da fotossíntese (PELLNY et al. 2004), além disso, Lunn et al. (2006)

constataram que a T6P, além de agir como um metabólito regulador do status do açúcar em plantas, também media mudanças induzidas pela sacarose na taxa de síntese de amido. Exceto pelo T2, o gene STPS2 não apresentou expressão diferencial significativa entre as plantas controle e estressada tanto para a cultivar tolerante quanto para a sensível. As TPSs de classe II de *A. thaliana* têm função específica ainda desconhecida, porém existem evidências de que estas atuem no controle da morfologia celular e do desenvolvimento da planta (CHARY et al., 2008) além de mediar respostas de sinais que ativam o gene SnRK1 (HARTHILL et al. 2006), uma proteína quinase que desempenha um papel chave no controle global do metabolismo de carbono na planta (HALFORD et al. 2003). Este é o primeiro relato da expressão de genes das duas classes de TPS em cana-de-açúcar cultivada. A expressão das TPSs, STPS1 e STPS2, em condições ambientais normais e sob estresse hídrico além da presença de várias outras TPSs na maioria dos tecidos da planta, são indícios da importância dessa via em cana-de-açúcar e da necessidade de posteriores estudos com ferramentas genéticas específicas visando o melhoramento da cana-de-açúcar cultivada.

VII. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- Esta é o primeiro relato da expressão de genes da trealose nos híbridos de cana-de-açúcar brasileiros (*Saccharum* spp) . Assim como em *Arabidopsis thaliana*, a cana-de-açúcar possui mais de um gene (isoforma) para a trealose-6-fosfato sintase (TPS). Através da expressão *in silico* foi possível confirmar que a TPS é expressa em todos os tecidos da cana-de-açúcar.

- A cana-de-açúcar possui genes das duas subfamílias de TPS conhecidas, as com domínio TPP inativo e ativo (classe I e II). Os genes STPS1 e STPS2 são representantes respectivamente da classe I e II das TPSs de cana. O cDNA do STPS1 e STPS2 contido no vetor de clonagem não representa a seqüência completa do gene, mais foi suficiente para sua classificação e para os estudos de expressão.

- O uso da metodologia do RT-PCR permitiu constatar a expressão constitutiva dos genes STPS1 e STPS2 nas folhas de ambas as variedades estudadas sob condições normais e de estresse hídrico.

- O gene STPS1 parece ter uma expressão diferencial entre as variedades estudadas com destaque para a manutenção da expressão na planta tolerante e repressão na planta sensível quando sob estresse. Já o STPS2 não mostrou variações consideráveis entre as plantas controle e sob estresse para as duas variedades.

- Experimentos com maior sensibilidade na detecção de diferenças de expressão como o RT-PCR quantitativo (QRT-PCR) devem ser realizados para a confirmação da expressão diferencial. Para ampliar as possibilidades nas pesquisas futuras torna-se necessárias a aplicação de técnicas como o RACE 3' e 5', necessário para a obtenção dos gene STPS1 e 2 completos .

VIII. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.M.; VILLALOBOS, E.; ARAÚJO, S.S.; LEYMAN, B.; VAN DIJK, P.; ALFARO-CARDOSO, L.; FEVEREIRO, P.S.; TORNÉ, J.M.; SANTOS, D.M. Transformation of tobacco with an *Arabidopsis thaliana* gene involved in trehalose biosynthesis increases tolerance to several abiotic stresses. **Euphytica**, v.146, p.165–176, 2005.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p. 403–410, 1990.

AVONCE, N.; LEYMAN, B.; GALLARDO-MASCORRO, J.O.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J.M.; ITURRIAGA, G. The Arabidopsis trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. **Plant Physiology**, v.136, p.3649-3659, 2004.

AVONCE, N.; MENDOZA-VARGAS, A.; MORETT, E.; ITURRIAGA, G. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. **BMC Evolutionary Biology**, v.6, p.109, 2006.

BIANCHI, G.; GAMBA, A.; LIMIROLI, R.; POZZI, N.; ELSTER, R.; SALAMINI, F.; BARTELS, D. The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. **Plant Physiology**, v.87, p.223-226, 1993.

BLAZQUEZ, M.A.; SANTOS, E.; FLORES, C.L.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; SALINAS, J.; GANCEDO, C. Isolation and characterization of the Arabidopsis *TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. **Plant Journal**, v.13, p. 685-689, 1998.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1035-1040, 1993.

BOSCH, S. **Trehalose and carbon partitioning in sugarcane**. Tese (Doutorado). - University of Stellenbosch - Stellenbosch. África do Sul, 195 p. 2006.

Cabib, E.; LELOIR, F.L. The biosynthesis of trehalose-6-phosphate, **Journal of Biological Chemistry**, v. 31, p. 259-275, 1958.

CALVACHE, M.; REICHARDT, K.; BACHI, O.O.S. Efeito de épocas de deficiência hídrica na evapotranspiração atual da cultura do feijão cv. Imbabello. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA**, 10, Piracicaba. Anais..., Piracicaba, SP: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", p. 668-670, 1997.

CARDING, S.R.; LU, D.; BOTTOMLY, K.A. A polymerase chain reaction assay for the detection and quantification of cytokine gene expression in small number of cells, **Journal of Immunological Methods**, v. 151, p. 277-287, 1992.

CHARY, S.N.; HICKS, G.R.; CHOI, Y.G.; CARTER, D.; RAIKHEL, N.V; Trehalose-6-Phosphate Synthase/Phosphatase Regulates Cell Shape and Plant Architecture in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 146, p. 97-107, 2008.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single Step Method on RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. **An. Biochem** v.162, p.156-159, 1987.

CONAB, 2008. <http://www.conab.gov.br>, capturada em 10/05/2008.

DILLEWIJN, C. Botany of sugar cane. Walthen: **Chronica Botanica**, p.136-141. 359p, 1952.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J.C. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 250, p. 405-413, 1996.

DRENNAN, P.M.; SMITH, M.T.; GOLDSWORTHY, D.; VAN STADEN, J. The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius*. Welw. **Journal Plant Physiology**, v. 142, p. 493-496, 1993.

EASTMOND, P.J.; VAN DIJKEN, A.J.H.; SPIELMAN, M.; KERR, A.; TISSIER, A.F.; DICKINSON, H.G.; JONES, J.D.G.; SMEEKENS, S.C.; GRAHAM, I.A. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. **Plant Journal**, v. 29, p. 225-235, 2002.

EASTMOND, P.J.; LI, Y.; GRAHAM, I.A. Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants? **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 533–537, 2003.

ERLICH, H.A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v. 252, p. 1643-1651, 1991.

FREEMAN, W.M.; WALKER, S.J.; VRANA, K.E.; Quantitative RT–PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, v. 26, p. 112–122, 1999.

GARG, A.K.; KIM, J.K.; OWENS, T.G.; RANWALA, A.P.; CHOI, Y.D.; KOCHIAN, L.V.; WU, R.J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 99, p. 15898-15903, 2002.

GODDIJN, O.J.M.; VERWOERD, T.C.; VOOGD, E.; KRUTWAGEN, R.W.H.H.; DE GRAAF, P.T.H.M.; POELS, J.; VAN DUN, K.; PONSTEIN, A.S.; DAMM, B.; PEN, J. Inhibition of thehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 113, p. 181–190, 1997.

GODDIJN, O.; SMEEKENS, S.; Sensing trehalose biosynthesis in plants. **Plant Journal**, v. 14, p. 143-146, 1998.

HALFORD, N.G.; HEY, S.; JHURREEA, D.; LAURIE, S.; MCKIBBIN, R.S.; PAUL, M.; ZHANG, Y. Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 467-475, 2003.

HARTHILL, J.E.; MEEK, S.E.; MORRICE, N.; PEGGIE, M.W.; BORCH, J.; WONG, B.H.; MACKINTOSH, C. Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. **Plant Journal**, v. 47, p. 211–223, 2006.

HUANG, X. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. **Genomics**, v. 14, p. 18–25, 1992.

JANG, I.C.; OH, S.; SEO, J.S.; CHOI, W.B.; SONG, S.Y.; KIM, C.H.; KIM, Y.S.; SEO, H.S.; CHOI, Y.D.; NAHM, B.H.; KIM, J.K. Expression of a bifunctional fusion of the Escherichia coli genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. **Plant Physiology**, v. 131, p. 516–524, 2003.

KANDROR, O.; DELEON, A.; GOLDBERG, A.L. Trehalose synthesis is induced upon exposure of Escherichia coli to cold and is essential for viability at low temperatures. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, p. 9727–9732, 2002.

KARIM, S. Exploring plant tolerance to biotic and abiotic stresses. Tese (Doutorado) - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suécia, p.66, 2007.

KOLBE, A.; TIESSEN, A.; SCHLUEPMANN, H.; PAUL, M.; ULRICH, S.; GEIGENBERGER, P. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. **Proc Natl Acad Sci**, v.102(31), p. 11118-11123, 2005.

KOSMAS, S. A.; ARGYROKASTRITIS, A.; LOUKAS, M.G.; ELIOPOULOS, E.; TSAKAS, S.; KALTSIKES, P.J. Isolation and characterization of drought-related trehalose 6-phosphate-synthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Planta**, v. 223, p. 329-339, 2006.

LEYMAN, B.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J.M. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. **Trends Plant Science**, v. 6, p. 510–513, 2001.

LUNN, J.E.; FEIL, R.; HENDRIKS, J.H.M.; GIBON, Y.; MORCUENDE, R.; OSUNA, D.; SCHEIBLE, W.R.; CARILLO, O.; HAJIREZAEI, M.R.; STITT, M. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical Journal**, v. 397(1), p. 139-48, 2006.

MAPA, 2008. <http://www.agricultura.gov.br>, capturada em 14/05/2008

MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S.H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Res**, v.32, p. 327–331, 2004.

MARONE, M.; MOZZETTI, S.; DERITIS, D.; PIERELLI, L.; SCAMBIA, G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. **Biol. Proced. Online**, v. 3, p. 19– 25, 2001.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Produção e Agroenergia. **Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011**. 2. ed. rev. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, p. 110, 2006.

MULLER, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. **Plant Science**., v. 112, p.1–9, 1995.

OMETO, J.C. Parâmetros meteorológicos e a cultura da cana-de-açúcar. Piracicaba: ESALQ, p. 17, 1980.

PELLNY, T.K.; GHANNOUM, O.; CONROY, J.P.; SCHLUEPMANN, H.; SMEEKENS, S.; ANDRALOJC, J.; KRAUSE, K.P.; GODDIJN, O.; PAUL, M.J. Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. **Plant Biotechnol J**, v. 2, p. 71–82, 2004.

REICHARDT, K. Dinâmica da matéria e da energia em ecossistemas. Piracicaba: USP/ESALQ, **Dept. Física e Meteorologia**, p. 513, 1996.

ROMBEL, I.T.; SYKES, K.F.; RAYNER, S.; JOHNSTON, A.S. ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification. **Gene**, v. 282, p. 33-41, 2002.

SACIOTO, R. F. Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, - Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 74, 2003.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evol**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2º ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHLUEPMANN, H.; PELLNY, T.; VAN DIJKEN, A.; SMEEKENS, S.; PAUL, M. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, p. 6849-6854, 2003.

SCHLUEPMANN, H.; VAN DIJKEN, A.; AGHDASI, M.; WOBES, B.; PAUL, M.; SMEEKENS, S. (2004). Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. **Plant Physiology**, v. 135, p. 879-890, 2004.

THALLER, M.C.; SCHIPPA, S.; ROSSOLINI, G.M. Conserved sequence motifs among bacterial, eukaryotic and archaeal phosphatases that define a new phosphohydrolase superfamily. **Protein Science**, v. 7, p. 1651-1656, 1998.

THEVELEIN, J.M. Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function. In: Brambl R, Marzluf GA (eds) *The Mycota*. Springer, Berlin-Verlag, p. 395-420, 1996.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

UNICA, 2008. <http://www.portalunica.com.br>, capturada em 14/05/2008.

VAN DIJKEN, A.J.; SCHLUEPMANN, H.; SMEEKENS, S.C. Arabidopsis trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. **Plant Physiology**, v. 135, p. 969-977, 2004.

VAN LAERE, A. Trehalose, reserve and/or stress metabolite? **FEMS Microbiol Rev**, v. 63, p. 201-210, 1989.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 1-4, 2001.

VOGEL, G.; FIEHN, O.; BRESSEL, L.J.R.D.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; AESCHBACHER, R.A.; WINGLER, A. Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1817-1826, 2001.

WIEMKEN, A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 58, p. 209-217, 1990.

WILKINSON, S.; DAVIES, W.J. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 195–210, 2002.

ZENTELLA, R.; MASCORRO-GALLARDO, J.O.; VAN DIJCK, P.; FOLCH-MALLOL, J.; BONINI, B.; VAN VAECK, C.; GAXIOLA, R.; COVARRUBIAS, A.A.; NIETO-SOTELO, J.; THEVELEIN, J.M.; ITURRIAGA, G. *Selaginella lepidophylla* trehalose 6-phosphate synthase complements growth and stress tolerance defects in a yeast tps1 mutant. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1473–1482, 1999.

ZHANG, S.Z.; YANG, B.P.; FENG, C.L.; CHEN, R.K.; LUO, J.P.; CAI, W.W.; LIU, F.H. Expression of the *Grifola frondosa* Trehalose Synthase Gene and Improvement of

Drought-Tolerance in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, p. 453 – 459, 2006.