Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Análise de expressão gênica e metabolismo primário em cana-de-açúcar: sinalização de açúcares

Camila Ribeiro

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2012

Camila Ribeiro
Bacharel em Biotecnologia

Análise de expressão gênica e metabolismo primário em cana-de-açúcar: sinalização de açúcares

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Ribeiro, Camila
Análise de expressão gênica e metabolismo primário em cana-de-açúcar: sinalização de açúcares / Camila Ribeiro.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
168 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Cana-de-açúcar 2. Expressão gênica 3. Fonte-dreno 4. Sinalização de acúcares I. Título

CDD 633.61
R484a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico este trabalho à minha família.

Reinaldo (*in memorian*), Nancy e Matheus.

"Love is all you need."

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz e ao Departamento de Genética pela oportunidade.

À CAPES e FAPESP pela bolsa de estudos e suporte financeiro do presente projeto de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate pela oportunidade.

Aos colegas do laboratório Max Feffer de Genética de Plantas.

Em especial à Ilara Budzinski, que colaborou tanto para o término desta dissertação levando minhas amostras para análise de metabólitos em seu Doutorado Sanduiche, e pela amizade durante esses dois anos.

Ao Ivanzão meu amigo querido, meu parceiro para todas as horas, vou sentir falta da sua companhia e de dividir com você esses momentos meus!

Ao Dr. David Henry Moon pela colaboração e muita animação durante os ensaios de transcriptômica, e auxilio na revisão do texto.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira- Piracicaba-SP pela disponibilização das plantas e o espaço para os experimentos de sinalização.

Ao Ümea Plant Science Centre - Ümea University- Suécia, que através do Prof. Thomas Moritz foi possível realizar os ensaios de metabolômica.

Ao Msc. Ricardo Silva, ao Prof. Dr. Ricardo Vêncio da FMRP/USP – Ribeirão Preto e ao Msc. Fabrício de Moraes, o mais novo bioinformata do Max Feffer pela colaboração nas análises computacionais dos dados.

Aos queridos funcionários da Genética da ESALQ, o pessoal da manutenção: o meu conterrâneo assisense Cláudio Segatelli, Aparecido Silva e ao sempre simpático Seu Aparecido Siqueira, que sempre me deram uma mão nas minhas tentativas de cultivo das plantas. E ao pessoal da garagem da genética: Norberto e Seu Natálio meus companheiros de coletas em campo.

À minha mãe e meu irmão pelo apoio incondicional.

Aos muitos amigos, amigas e amiguez que conheci em Pira com quem bati meu cabelo, tomei muitos bons drinki e que fizeram meus dias aqui muito mais divertidos! Foi muito bom conhecê-los e vou guardar todas as boas lembranças comigo sempre!

Ombro e byco! ☺

Obrigada!

Aos mistérios que através da ciência estamos a desvendar.

"No mistério do sem-fim
equilibra-se um planeta.

E, no planeta, um jardim,
e, no jardim, um canteiro;
no canteiro uma violeta,
e, sobre ela, o dia inteiro,

entre o planeta e o sem-fim,
a asa de uma borboleta".

Cecília Meireles

SUMÁRIO

Resumo 11
LISTA DE FIGURAS 14
LISTA DE TABELAS 19
Lista de Abreviaturas 21
1 INTRODUÇÃO 23
2 OBJETIVOS 25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 27
3.1 A cana-de-açúcar e os projetos SUCEST e SUCAST 27
3.2 Relação fonte-dreno e taxas fotossintéticas em cana-de-açúcar 28
3.3 Sinalização de açúcares 30
3.3.1 Sinalização de açúcares em plantas 34
3.3.2 Sinalização por sacarose em plantas 38
3.3.3 Sinalização por glicose em plantas 40
3.3.4 Sinalização por frutose em plantas 41
3.3.5 Sinalização por manose em plantas 43
3.4 Metabolismos potenciais para o estudo de sinalização de açúcares 44
3.5 Biologia sistêmica: estudos integrados de genômica, transcriptômica e metabolômica 57
4 MATERIAL E MÉTODOS 61
4.1 Material vegetal 61
4.2 Ensaios de sinalização de açúcares 61
4.2.1 Estabelecimento da metodologia de ensaio de sinalização exógena de açúcares 61
4.2.2 Ensaios de sinalização extracelular 62
4.3 Extração de RNA total 63
4.3.1 Quantificação e determinação da pureza do RNA extraído 64
4.3.2 Isolamento do RNA mensageiro e síntese de cDNA 64
4.4 Desenho de primers 65
4.5 Quantificação da expressão gênica pela análise de PCR quantitativo 67
4.5.1 Reações de PCR quantitativo 68
4.5.2 Normalização dos dados obtidos pela análise de PCR quantitativo 68
4.5.3 Cálculo da expressão gênica obtida por PCR quantitativo 68
4.6 Metabolômica 69

4.6.1 Extração dos metabólitos 69
4.6.2 Cromatografia gasosa e espectrometria de massas 70
4.6.3 Identificação dos metabólitos e análises estatísticas 71
5 RESULTADOS 73
5.1 Quantificação dos carboidratos e estabelecimento da concentração padrão dos ensaios de sinalização 73
5.2 Análises de expressão Gênica através de PCR quantitativo.....74
5.3 Metabolismo primário 80
6 DISCUSSÃO 97
6.1 Expressão gênica.....97
6.2 Metabolômica 118
6.3 Expressão gênica e metabolômica.....125
Referências 135
ANEXOS 159

RESUMO

Análise de expressão gênica e metabolismo primário em cana-de-açúcar: sinalização de açúcares

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), por acumular sacarose em altas concentrações tem sido o foco de diversas pesquisas bioquímicas e fisiológicas. A relação entre a atividade fotossintética do tecido fonte da folha e o acúmulo de sacarose no órgão dreno, o colmo, ainda não é bem compreendida. Em estudos prévios observou-se que a atividade fotossintética declina durante a maturação do colmo em cultivares comerciais. As folhas de cana-de-açúcar aparentam possuir a capacidade de aumentar o fornecimento de açúcares para o colmo sob condições de aumento da demanda. E ainda, em plantas superiores, o açúcar tem um importante papel no controle do crescimento e desenvolvimento, no entanto, as vias de sinalização e seus correspondentes mecanismos moleculares e metabólicos, ainda estão sendo decifrados. Porém, as informações a respeito da regulação por açúcares são escassas em cana-de-açúcar. Assim, para compreender os mecanismos relacionados ao acúmulo de sacarose e os mecanismos metabólicos de sinalização de açúcares e análogos, realizou-se ensaios de sinalização exógena de açúcares, acompanhando as alterações do transcriptôma e metabolôma, de modo a relacionar essas informações para obtermos uma visão de biologia sistêmica.

A partir deste estudo foi possível identificar relações entre a sinalização de açúcares e seus homólogos, o desenvolvimento da cana-de-açúcar e as diversas vias em que estes podem atuar, tais como; glicólise, transportadores de açúcares, genes sinalizadores, metabolismo de sacarose e trealose. No que se refere ao desenvolvimento da planta, notou-se diferenças temporais na maneira pela qual os açúcares são reconhecidos, podendo estar relacionado às alterações de papel da folha (dreno-fonte) ao longo do desenvolvimento. Observou-se uma sensibilidade maior aos 12 meses, do que aos 4 meses, tanto para a ação dos açúcares quanto para o efeito osmótico, em que houveram maiores alterações no perfil de expressão gênica e na quantidade de metabólitos diferenciais. No entanto, as respostas de alterações de expressão e concentração de metabólitos aparentam ser opostas. E ainda, a concentração ótima de açúcar para desencadear uma sinalização positiva, deve ser posteriormente investigada.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Sinalização de açúcar; Fonte-Dreno

ABSTRACT

Sugarcane gene expression and primary metabolism analysis: sugar signaling

Sugarcane (*Saccharum spp.*), due the capacity of sucrose accumulation in high concentrations has been the focus in diverse biochemical and physiological studies. The relationship between leaf photosynthesis and sugar accumulation in the sink organ, the culm, is still not fully understood. In previous studies it has been observed that photosynthesis declines during culm maturation in commercial cultivars. Sugarcane leaves appears to posess the capacity to increase the sugars supply at the culm under increased conditions demand. In higher plants, sugar has an important role controlling growth and development, however, the signaling networks and their molecular and metabolic components are still not fully understood. To understand the mechanisms related to sugar accumulation and the metabolic mechanisms of sugar signaling, exogenous sugar signaling assays were performed. Followed by transcriptomics and metabolomics analyzes using a systems biology approach.

Through this study it was possible to identify the relationship between the sugars and homologues signaling, the sugarcane development and the diverse pathways where they can act, such as glicolysis, sugar transporters, signaling genes, sucrose and trehalose metabolism. At the plant development, it was possible to notice time differences on the way the sugars were recognized, what can be related to the changing leaf roles, (sink-source) through the development. Also a higher sensitivity at 12 months than 4 months, as for the sugar signaling action or as the osmotic effect was observed, which presented higher expression profile and metabolic amount alteration. However the gene expression and metabolic responses seems to be opposite. Still, an optimal sugar concentration to develop a positive signaling should be forward investigated.

Keywords: Sugarcane; Sugar signaling; Source-sink

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da Relação Fonte-Dreno ao longo do Desenvolvimento da cana-de-açúcar.....29
Figura 2 - Diagrama representando dois diferentes modelos de sinalização por proteínas quinases após estímulos por sinais externos.....31
Figura 3 - Vias de sinalização por glicose em *Saccharomyces cerevisae*.....33
Figura 4 - Tipos de sinalização de açúcares- dependentes e independentes de Hexoquinase.....35
Figura 5 - O complexo de sinalização AtHXK1 desencadeia a expressão de genes fotossintéticos em *Arabidopsis,* dependendo da concentração de glicose 36
Figura 6 - Resumo dos impactos da sinalização de sacarose na fisiologia e no desenvolvimento das Plantas.....39
Figura 7 - Modelo de sinalização de hexoses durante o desenvolvimento precoce de mudas de A. thaliana.....42
Figura 8 - Esquema demonstrando as principais reações de glicólise e gliconeogênese em plantas.....46
Figura 9 - Metabolismo da trealose.....49
Figura 10 - Síntese da Sacarose a partir da UDP glicose e suas 3 enzimas principais- SPS, SP e SUSY.....52
Figura 11 - Tratamentos exógenos com soluções de açúcares 63
Figura 12 - Fórmula para o cálculo da concentração de RNA (µg μL^{-1}) 64
Figura 13 - Figura com os cromatogramas obtidos a partir do ensaio de HPLC para quantificação de carboidratos.....73
Figura 14 - Escolha dos genes normalizadores- par mais estável obtido através do software Normfinder.....74
Figura 15 - Expressão relativa entre 12 e 4 meses.....75
Figura 16 - Teste para controle de efeito osmótico no ensaio de sinalização de açúcares.....76
Figura 17 - Análise das expressões gênicas dentre todos os tratamentos experimentais sob os controles manitol e água- 4 meses.....77

Figura 18 - Análise das expressões gênicas dentre todos os tratamentos experimentais sob os controles manitol e água- 4 meses.....77
Figura 19 - Expressão relativa do ensaio de sinalização de açúcares utilizando como controle o tratamento com manitol aos 4 meses.....78
Figura 20 - Expressão relativa do ensaio de sinalização de açúcares utilizando como controle o tratamento com manitol aos 12 meses.....79
Figura 21 - Classes de metabólitos identificados em folhas de cana-de-açúcar.....82
Figura 22 - Figura ilustrando o alinhamento do metabólito ácido quiníco, com amostras provenientes de todos os tratamentos.....82
Figura 23 - PCAs entre idades das plantas e tratamentos aplicados (perspectiva Vertical).....83
Figura 24 - PCAs entre idades das plantas e tratamentos aplicados (perspectiva Horizontal).....84
Figura 25 - OPLS demonstrando as diferenças nos padrões de metabólitos entre as amostras sem tratamento e as amostras tratadas com água.....85
Figura 26 - Relações de diferenças entre os padrões de metabólitos entre as amostras sem tratamentos e as tratadas com água.....85
Figura 27 - PCA tratamentos diferenciais aos 4 e 12 meses frutose.....86
Figura 28 - PCA tratamentos diferenciais aos 4 e 12 meses sacarose.....87
Figura 29- *Heat map* amostras não tratadas entre 4 e 12 meses.....88
Figura 30 - *Heat map* amostras com 12 meses.....89
Figura 31 - *Heat map* amostras com 4 meses.....90
Figura 32 - Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R. metabólitos diferenciais entre 4 e 12 meses amostras sem tratamento utilizando 4 meses como controle.....91
Figura 33 - Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R. metabólitos diferenciais entre 4 e 12 meses amostras tratadas com água utilizando 4 meses como controle.....92
Figura 34 - Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R. metabólitos diferenciais entre 4 e 12 meses amostras tratadas com manitol utilizando 4 meses como controle.....92
Figura 35 - Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 4 meses controle manitol.....93

Figura 36 - Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 4 meses controle água.....94
Figura 37 - Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 12 meses controle manitol.....94
Figura 38 - Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 12 meses controle água.....95
Figura 39 - Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 4 meses controle água. Análise sem manose.....95
Figura 40 - Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 12 meses controle água. Análise sem manose.....96
Figura 41 - Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 12 meses controle manitol. Análise sem manose.....96
Figura 42 - Perfi de expressão gênica dos genes envolvidos na glicólise, aos 4 e aos 12 meses.....100
Figura 43 - Genes relacionados com sinalização celular, aos 4 e aos 12 meses 102
Figura 44 - Perfis de expressão dos transportadores de açúcares, aos 4 e aos 12 meses.....103
Figura 45 - Via metabólica da trealose.....104
Figura 46 - Perfil de expressão dos genes relacionados ao metabolismo da trealose aos 4 e aos 12 meses.....105
Figura 47 - Perfil de expressão dos genes relacionados à síntese de sacarose aos 4 e aos 12 meses.....107
Figura 48 - Perfil de expressão dos genes relacionados à síntese de sacarose x *SNF related kinase* entre 4 e 12 meses.....108
Figura 49 - Análise das respostas de sinalização através da fosforilação por hexoquinase dos açúcares, em resposta aos tratamentos glicose e manose.....110
Figura 50 - Relação padrões de expressão das hexoses glicose, frutose e manose aos 4 meses 110
Figura 51 - Relação padrões de expressão das hexoses glicose, frutose e manose aos 12 meses.....111

Figura 52 - Relação dissacarídeo (sacarose) *versus* monossacarídeos componentes (glicose e frutose) aos 4 meses.....112
Figura 53 - Relação dissacarídeo (sacarose) *versus* monossacarídeos componentes (glicose e frutose) aos 12 meses.....112
Figura 54 - Relação dissacarídeo (sacarose) *versus* monossacarídeo não componente (manose) aos 4 meses.....113
Figura 55 - Relação dissacarídeo (sacarose) *versus* monossacarídeo não componente (manose) aos 12 meses.....114
Figura 56 - Perfil de expressão gênica ao longo do desenvolvimento da planta entre 4 e 12 meses, amostras tratadas com água, amostras de 4 meses como controle.....115
Figura 57 - Via representando o ensaio de sinalização através dos tratamentos extracelulares com açúcares exógenos perfil de expressão gênica aos 4 meses.....116
Figura 58 - Via representando o ensaio de sinalização através dos tratamentos extracelulares com açúcares exógenos perfil de expressão gênica aos 12 meses.....117
Figura 59 - Metabólitos diferenciais identificados entre 4 e 12 meses.....119
Figura 60 - Mapa do metabolismo primário de folhas obtido no presente projeto.....125
Figura 61 - Porcentagem de aumentos e diminuição da expressão dos genes significativamente diferenciais e da concentração dos metabólitos significativamente diferenciais ao longo do desenvolvimento.....126
Figura 62 - Porcentagem de genes reprimidos e com alta expressão após o ensaio de sinalização de açúcares.....128
Figura 63 - Porcentagem de metabólitos diferenciais cuja concentração aumentou ou diminuiu após o ensaio de sinalização de açúcares.....129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes selecionados a partir dos respectivos SAS (SUCEST).....66
Tabela 2 - Sequência dos *primers desenhados para os ensaios de* qPCR 67
Tabela 3 - Metabólitos identificados nas folhas de cana-de-açúcar, através do programa ChromaTOF.....80

LISTA DE ABREVIATURAS

qPCR- Quantitative Polymerase Chain Reaction,

SUCEST- Sugarcane EST Project.

GC-TOF/MS- Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de Massas.

SAS- Sugarcane Assembled Sequences.

SUCAST- Sugarcane Signal Transduction.

EST- expressed sequence tag.

PFP- Fosfofruto fosfatase

PFK- Fosfofrutoquinase

FBA- Frutose bisfosfato Aldolase

F6P- Frutose 6 Fosfato

G6P- Glicose 6 Fosfato

SPS- Sacarose 6 Fosfato Sintase

SUSY- Sacarose Sintase

G1P- Glicose 1 Fosfato

HXK2 – Hexoquinase 2

Mig 1- proteina repressora no núcleo.

Snf1- Sucrose non-fermenting 1.

HXT- Transportadores de Hexoses

SnF3- Sucrose non- fermenting 3.

T6P- Trealose 6 FosfatoAMPK- AMP- dependent protein kinase

SnRKs- Sucrose non- fermenting Related Kinases

Kin10 e 11- kinesin-like protein.

bZip- Fatores de transcrição

Rgt1/2- yeast protein extract.

MHT1- Protein synthesis inhibitor.

CTR1- Calreticulina.

EIN3- ethylene insensitive 3.

ABA- ácido abscísico

VHA-B1- Vacuolar ATPase subunit B1.

RPT5B- partícula 19S da subunidade proteossômica

rolC- promotor floema específico de *Agrobacterium rhizogenes.*

VvHT1- Transportador de hexose.

ATB2- Fator de transcrição.

RNAm – RNA mensageiro

ASN1- Asparagina Sintetase 1

ProDH2- Prolina Desidrogenase.

VHA-B1- vacuolar H+-ATPase B1

CAB2- Chlorophyll A/B binding

FRK- Frutoquinase

GIN1/2- glucose Insensitive 1 e 2.

INPYR- Pirofosfatase inorgânica.

TPS- Trealose 6 Fosfato sintase.

T6Pase- Trealose 6 Fosfato FosfataseTPiso- Triosefosfato isomerase.

G6Pt- Transportador de Glicose 6 Fosfato

MAPK- Mitogen- activated protein kinase.

SUTY- Sugar transporter type 2a.

GAPDH- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

ACT- Actina

TUB- Tubulina

1 INTRODUÇÃO

"Sugarcane fields forever."

Caetano Veloso

A cana-de-açúcar é a mais importante fonte de sacarose no mundo. Sugere-se que a acumulação de altas concentrações de sacarose em cana-de-açúcar é regulada principalmente pelo dreno (colmo), em que o balanço simultâneo entre a síntese e degradação de sacarose, usualmente referido como uma ciclagem fútil pode ser responsável pelo acúmulo de sacarose (WHITTAKER e BOTHA, 1997). O alto nível de sacarose (mais de 650 mM) em tecidos de armazenamento, em alguns híbridos de *Saccharum* spp., faz da cana-de-açúcar um importante gênero modelo para os estudos de interação entre tecidos de fonte (folhas) e dreno.

No entanto, a cana-de-açúcar apresenta o principal desafio nesses estudos, visto que a sacarose é armazenada no parênquima do colmo e não em órgãos especializados de armazenamento, como no caso das raízes tuberosas. Assim, identificar e interpretar eventos relacionados ao metabolismo de sacarose é dificultado pelo fato de que o entrenó mais jovem é o tecido primário o dreno em crescimento, e o entrenó maduro é o dreno de armazenamento primário.

Além disso, melhorar o rendimento em biomassa, aumentando a concentração de sacarose no colmo é o objetivo chave da maior parte dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar. No entanto, em variedades recém-melhoradas alcançou-se o melhor rendimento em produção da planta, porém sem aumentar a concentração de sacarose no colmo (JACKSON, 2005). Por isso, é necessário um conhecimento maior do metabolismo de sacarose, transporte e interações entre fonte-dreno que regulam o acúmulo de sacarose.

Apesar das pesquisas relacionadas a esse assunto, a dinâmica e interações entre esses processos ainda não foram bem caracterizados e apenas estão começando a ser explorados.

Um passo chave para o entendimento dos fatores que controlam o acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar será o estudo do complexo metabólico e canais de sinalização que medeiam às relações entre fonte e dreno.

Alguns estudos fornecem evidências sobre uma relação dreno-dependente, em que os níveis de carbono em órgãos de armazenamento influenciam a rede de

atividade fotossintética e a assimilação de carbono em folhas (tecidos de fonte) (PAUL e PELLNY, 2003). Outros estudos evidenciaram que a atividade de enzimas relacionadas à fotossíntese e a expressão de genes associados às folhas, entre outros, são influenciados pelo status local do transporte primário de açúcares, sacarose e/ou suas hexoses constituintes (ROLLAND et al., 2002; FRANCK et al., 2006). No entanto, os mecanismos de como os açúcares atuam para regular a expressão gênica da fonte estão começando a ser descobertos (ROLLAND et al., 2002; GIBSON, 2005).

Análises de expressão gênica em série, nas quais é possível montar um perfil de padrões de expressão gênica, quantitativo e qualitativo, foram utilizadas para caracterizar o transcriptoma de folha de cana-de-açúcar como um potencial passo limitante para o entendimento do acúmulo de sacarose no colmo (CALSA e FIGUEIRA, 2007).

Em trabalhos recentes, evidenciou-se que a demanda do dreno limita a atividade de fonte através de uma proteína quinase mediada por sinalização de açúcares que está correlacionada a um decréscimo nas concentrações de hexoses na fonte (MCCORMICK et al., 2008b).

Visando aprofundar os estudos relacionados ao acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar, desenvolveu-se uma análise conjunta de perfis transcricionais e metabólicos. Visto que, a partir de genes relacionados ao acúmulo de sacarose, evidenciados em estudos prévios; analisaram-se as influências extracelulares de açúcares e análogos em folhas.

Assim, foi possível relacionar as vias metabólicas de genes responsivos ao acúmulo de açúcares à reconfiguração do metaboloma de folhas de plantas jovens e adultas, em resposta aos ensaios de sinalização de açúcares, comparando os dados obtidos com os perfis de expressão gênica, analisados a partir da quantificação relativa utilizando a técnica de PCR Quantitativo.

2 OBJETIVOS

Com a finalidade de aprofundar os estudos relacionados ao metabolismo de acúmulo de sacarose e sinalização de açúcares, foi utilizada uma abordagem de associação entre ensaios de transcriptômica e metabolômica.

1) Análise dos perfis de expressão gênica em amostras de folhas de plantas jovens e adultas em resposta aos ensaios de sinalização das amostras utilizando PCR em Tempo Real.

2) Análises do perfil metabólico primário em amostras de folhas de plantas jovens e adultas em resposta aos ensaios de sinalização utilizando espectrometria de massas (GC-TOF/MS).

3) Correlação dos dados obtidos através dos ensaios de expressão gênica com a reconfiguração dos metabólitos em resposta aos tratamentos aplicados, e construção dos sistemas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A cana-de-açúcar e os projetos SUCEST e SUCAST

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das mais importantes espécies vegetais cultivadas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, atingindo uma área superior a 20 milhões de hectares em 101 países. (FAO 2010). O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar, produzindo 24 milhões de toneladas por ano. A produção brasileira de etanol também é a maior do mundo, com 14 bilhões de litros de álcool por ano, devido à sua utilização em larga escala como combustível renovável alternativo ao petróleo (GOLDEMBERG e GUARDABASSI, 2009). Devido a sua capacidade única de estocar sacarose em seus entrenós o estudo da cana-de-açúcar tornou-se uma importante fonte de informações no que se diz respeito à síntese de sacarose, seu transporte e acúmulo. Os componentes da via de biossíntese de sacarose bem como seus reguladores, tornaram-se potenciais alvos para o melhoramento dirigido das variedades de cana-de-açúcar (MOORE, 2005).

Os mecanismos de acúmulo de sacarose têm sido estudados em diversos níveis: identificação e caracterização de genes individuais nas vias metabólicas de sacarose e transportadores da sacarose na planta (MOORE,1995; GROF e CAMPBEL 2001, MOORE, 2005), localização de genes (CASU et al., 2003; RAE et al., 2005), o desenvolvimento de mapas genômicos e a localização de loci quantitativos (HOARAU et al., 2001; MING et al., 2002a; MING et al., 2002b; MING et al., 2002c; AITKEN et al., 2006), estudos de transcriptoma (CARSON e BOTHA 2000; CARSON e BOTHA 2002; CASU et al., 2003; CASU et al., 2004, CASU et al., 2007); estudo de atividades enzimáticas individuais e fluxo de atividades enzimáticas (LINGLE, 1999; ROHWER e BOTHA, 2001; TURNER e BOTHA, 2002; HOEPFNER e BOTHA, 2004) e relação do estresse hídrico e acúmulo de sacarose (ISKANDAR et al., 2011).

O projeto brasileiro de seqüenciamento de ESTs da cana-de-açúcar (SUCEST) disponibilizou um conjunto básico e fundamental de dados para um maior entendimento dos processos fisiológicos e bioquímicos da cana-de-açúcar. Foram gerados 43.141 prováveis transcritos de cana-de-açúcar (SASs, *Sugarcane Assembled Sequences*), dos quais cerca de 29,7% não apresentam nenhuma

homologia com seqüências gênicas ou protéicas previamente identificadas em qualquer outro organismo (VETTORE et al., 2003).

A partir daí com o objetivo de caracterizar as seqüências obtidas através do projeto SUCEST e identificar genes de cana-de-açúcar com potencial biotecnológico, foram iniciados diversos projetos em laboratórios especializados em diferentes linhas de pesquisa. Um deles foi o SUCAST (*Sugarcane Signal Transduction*), um projeto criado para identificar ESTs envolvidos em vias de transdução de sinais na cana-de-açúcar (SOUZA et al., 2001). Em trabalhos prévios atuou-se na utilização de arrays de cDNA para a identificação e caracterização de genes de cana envolvidos com síntese e acúmulo de sacarose. Um total de 203 genes foram detectados como diferencialmente expressos em folhas e entrenós 1, 5 ou 9 de plantas contrastantes para quantidade de sacarose (FELIX, 2006; FELIX et al., 2009; PAPINI-TERZI et al., 2007). Outros estudos usando microarranjos foram conduzidos comparando entrenós em diferentes estádios de desenvolvimento, visando detectar alterações gênicas relacionadas com a capacidade do entrenó de armazenar sacarose (PAPINI-TERZI et al., 2007). Somando-se todos os genes associados ao acúmulo de sacarose, foram identificados 343 alvos.

3.2 Relação fonte-dreno e taxas fotossintéticas em cana-de-açúcar

Em cana-de-açúcar as células do mesófilo foliar representam o órgão principal de fonte e o produto da fotossíntese, principalmente sob a forma de sacarose, é transportado para meristemas e órgãos em desenvolvimento. Já folhas jovens em crescimento e o colmo constituem os órgãos importadores (dreno) de carboidratos mais importantes Figura 1 (CHAMBRA et al., 2011).

Órgãos de fonte e dreno devem ser coordenadamente regulados pela expressão gênica e atividade enzimática de forma a produzir crescimento rápido e acúmulo de sacarose eficiente (CHAMBRA et al., 2011).

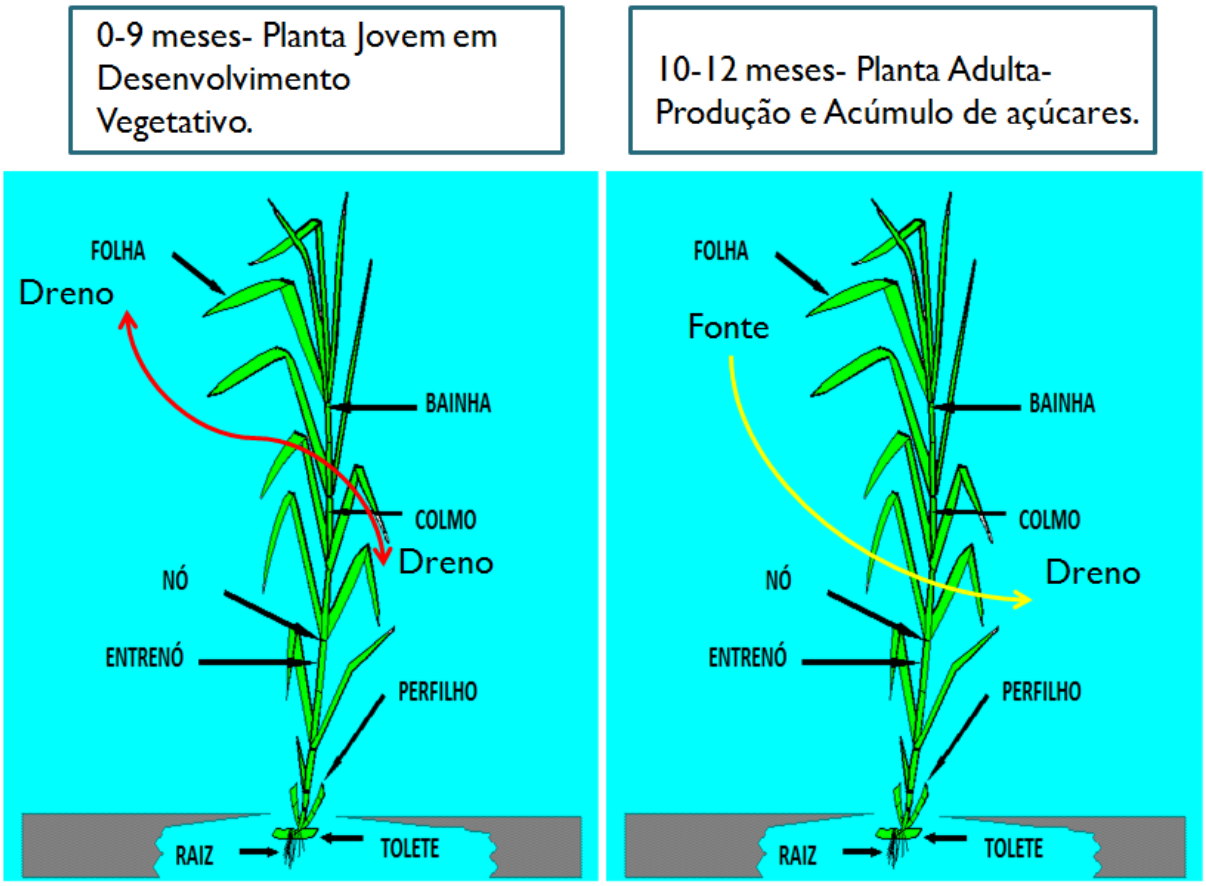


Figura 1- Esquema da Relação Fonte-Dreno ao longo do Desenvolvimento da cana-de-açúcar

A sacarose sintetizada nas folhas é transportada por transportador específico pelos vasos do floema até os colmos, onde passa para o espaço apoplástico. Nesse espaço, a sacarose, através da ação de invertases extracelulares, é convertida a glicose e frutose e esses monossacarídeos entram nas células do parênquima através de transportadores específicos (KROOK et al., 2000).

Dentro dessas células, frutose e glicose são transformadas em sacarose-fosfato (através da enzima sacarose fosfato sintase), que é transportada para o interior dos vacúolos. A sacarose armazenada nos vacúolos pode ser mobilizada via ação de invertases, que levam à quebra e geração de frutose e glicose. Esses açúcares difundem-se então para o citoplasma das células do parênquima (KROOK et al., 2000).

O acúmulo de sacarose em elevadas concentrações como ocorre na cana-de-açúcar, representa um estresse osmótico para as células e leva à necessidade de um controle eficiente da compartimentalização dos solutos (MOORE et al., 1995).

3.3 Sinalização de açúcares

Carboidratos: substratos e sinalizadores

Desde seu surgimento as plantas possuem papel crucial na evolução da vida na terra através da produção de moléculas de açúcares ricas em energia e oxigênio através de fixação fotossintética de carbono. Açúcares são carbonos primários e fontes de energia necessárias para a construção e abastecimento das células e desde os primórdios evolutivos adquiriram importância na regulação das funções de controle do metabolismo, resistência a estresses, crescimento e desenvolvimento (RAMON et al., 2008).

Para microorganismos de vida livre, a disponibilidade de nutrientes é um fator principal no controle do crescimento em um ambiente em constante mudança, enquanto que organismos multicelulares necessitam manter a homeostase de nutrientes e energia dentre suas células e tecidos. Assim os açúcares podem atuar como complemento e interagir com uma variedade de hormônios e fatores de crescimento em sistemas complexos (RAMON et al., 2008).

A produção de açúcar em plantas sésseis monitorando o status energético e dos açúcares é particularmente crítico, possibilitando a integração de sinais ambientais e de desenvolvimento necessários para sua plasticidade fisiológica e de desenvolvimento. Diferentemente dos hormônios e fatores de transcrição, no entanto, os açúcares estão presentes em escala milimolar e participam ativamente no metabolismo, o que faz da investigação sobre sua função dualista no metabolismo e sinalização um grande desafio (RAMON et al., 2008).

Além disso, o papel essencial dos açúcares no crescimento e desenvolvimento das plantas foi descoberto utilizando-se Arabidopsis como o primeiro sistema modelo. Muitas revisões foram publicadas sobre o assunto: (KOCH, 1996;;; SMEEKENS, 2000; ROLLAND et al., 2002; LEON and SHEEN, 2003; GIBSON, 2005; ROLLAND et al., 2006; SMITH e STITT, 2007).

Gerando sinais de açúcares

As plantas como organismos fotoautotróficos produzem seus próprios açúcares através da fotossíntese. Assim, para coordenar todos esses processos e responder apropriadamente às mudanças ambientais (que afetam o metabolismo energético, e alteram as demandas metabólicas e energéticas durante o desenvolvimento), as plantas adquiriram um arranjo de mecanismo para sentir esses diversos “sinais de açúcares”. Uma comunicação eficiente entre as atividades em diferentes órgãos, tecidos e compartimentos subcelulares é crucial para um uso ótimo desse recurso disponível para o crescimento e desenvolvimento (RAMON et al., 2008) (Figura 2).

Nos últimos anos, tornou-se evidente o papel central desempenhado pelos açúcares como estímulos sinalizadores e seus efeitos de respostas no crescimento, desenvolvimento e regulação metabólica das plantas.

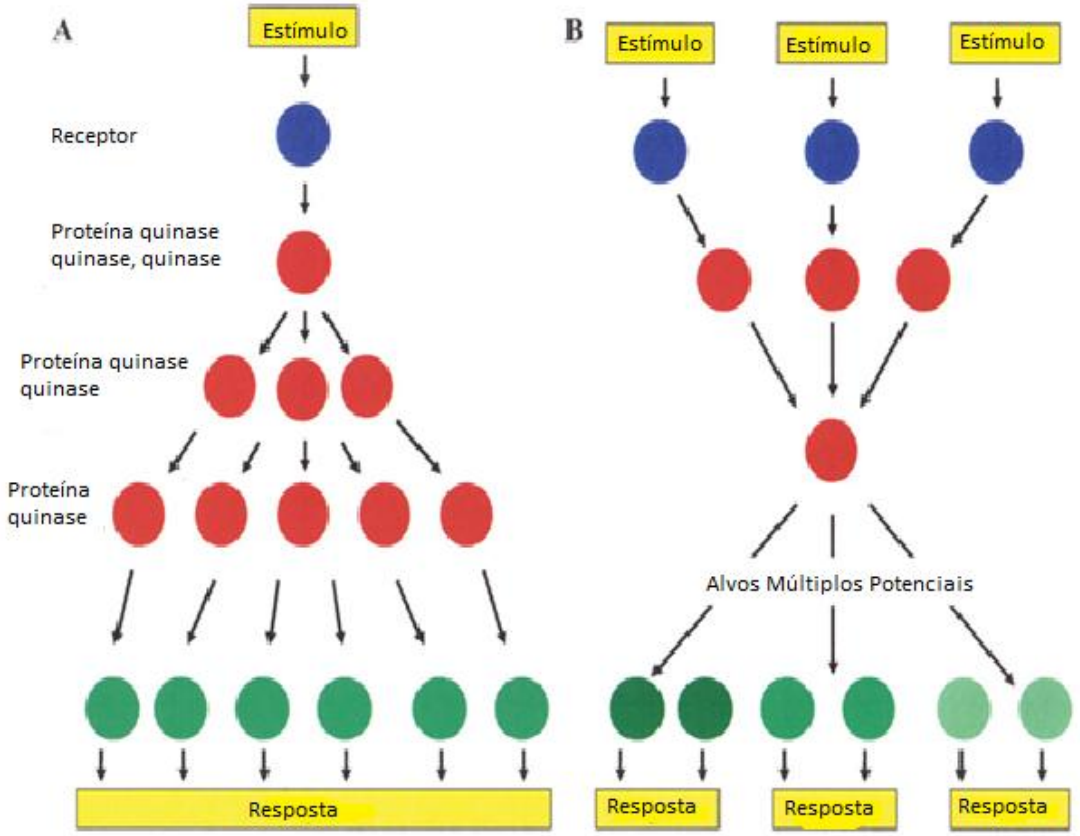


Figura 2 - Diagrama representando dois diferentes modelos de sinalização por proteínas quinases após estímulos por sinais externos. A- 1 estímulo, múltiplas proteínas kinases e 1 tipo de resposta e B- Múltiplos estímulos 1 proteína quinase e múltiplas respostas. Adaptado (HALFORD E HEY 2009)

A levedura como modelo em vias de sinalização por açúcares

Em geral, as leveduras provaram ser muito úteis como modelo e ferramenta experimental para ensaios de genética reversa de biologia de células eucarióticas. *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo anaeróbico facultativo que mesmo na presença de oxigênio, prefere a fermentação de açúcares como glicose, frutose e sacarose para uma maior eficiência energética respiratória. Possui ploriferação rápida e produção de etanol reutilizável durante a fermentação aparentemente oferece uma vantagem seletiva sob microorganismos pouco-tolerantes a álcool (ROLLAND et al., 2006).

Esta levedura desenvolveu um completo arranjo de vias de sensibilidade e sinalização de glicose para permitir o uso ótimo e exclusivo desta fonte de carbono (ROLLAND et al., 2006).

Estudos em *Saccharomyces demonstraram* que o gene Hxk2 (hexoquinase-2) exerce papel fundamental na repressão de genes relacionados ao catabolismo de fontes de carbono não fermentescíveis em resposta a alta concentração de glicose no meio(ALMS, et al., 1999; MORENO et al, 2005). Esta repressão ocorre pela interação de Hxk2 com a proteína repressora Mig1 no núcleo (AHUATZI et al, 2007), impedindo a fosforilação desta última pela proteína quinase Snf1 (*Sucrose non-fermenting1*). A fosforilação de Mig1 é promovida por Snf1 em baixas concentrações de glicose e determina sua exportação do núcleo e a liberação de genes reprimidos relacionados ao catabolismo de fontes alternativas de carbono como a sacarose (SARMA, et al., 2007) e ao metabolismo aeróbico (POLGE E THOMAS, 2007) (Figura 3).

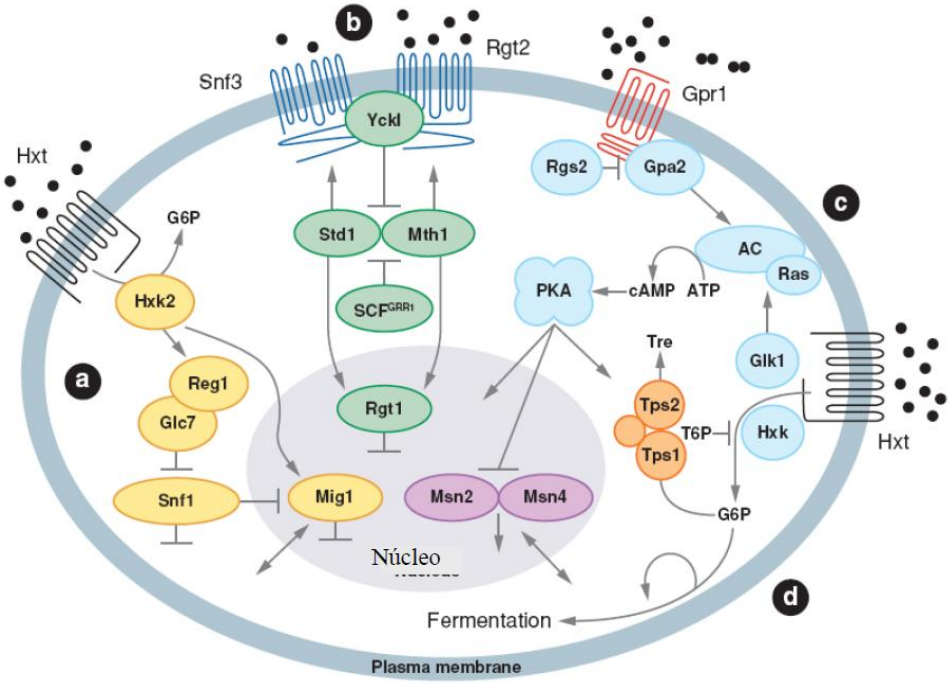


Figura 3 - Vias de sinalização por glicose em *Saccharomyces cerevisae,* a) A HXK2 funciona como sensor e se transloca para o núcleo em resposta à glicose. Snf1 (Sucrose nonfermenting 1) é requerida para liberação de genes reprimidos relacionados a fontes alternativas de energia em caso de privação de carbono. b) Via de indução de HXT. Dois transportadores homólogos de hexose. SnF3 e Rgt2, funcionam como sensores de glicose na membrana plasmática, onde ativam a Caseína quinase 1 (Yck1). c) A via da proteína quinase A dependente de AMP-cíclico com dois sistemas de sensibilidade à glicose: O sinal da glicose (ou sacarose) extracelular é recebido pela proteína-G acoplada a um receptor e fosforilação intracelular da hexose. d) A atividade glicolítica e a expressão de genes são controladas por intermédiários metabólicos, incluindo trealose-6-fosfato (T6P), que inibe a atividade da HXK2. Esquema adaptado por BRANCO, 2008 de ROLAND et al., (2006)

A proteína Snf1 possui grande similaridade com a família das quinases AMPk (*AMP-dependent protein kinase)* de mamíferos (HONG et al, 2003) e SnRKs *(Sucrose non-fermenting related kinases*) de plantas (HALFORD E HARDIE, 1998). Estas proteínas quinases desempenham papéis fundamentais na manutenção da homeostasia energética e as similaridades observadas entre estas proteínas sugerem mecanismos de monitoramento energético conservado em todos os eucariotos (POLGE E THOMAS, 2007).

3.3.1 Sinalização de açúcares em plantas

Estudos fisiológicos e moleculares têm demonstrado que a síntese e transporte de açúcar são processos altamente regulados, sendo que vários genes possuem regulação transcricional e pós-transcricional frente a mudanças nos níveis intracelulares de açúcar (SHEEN et al., 1999; XIAO et al., 2000). Por exemplo, determinados açúcares podem favorecer a expressão de enzimas em conexão com a biossíntese, utilização e armazenamento de suas reservas (incluindo amido, lipídeos e proteínas), podendo também, agir reprimindo a expressão de enzimas envolvidas na fotossíntese e mobilização de reservas.

A sensibilidade aos açúcares pode ser extracelular, nos níveis de transportadores e receptores de açúcares, sensibilidade extracelular através da ação de uma hexokinase ou uma kinase do complexo SNF1 que possui um papel crucial a ser desvendado, além de fosfatases e vários outros complexos protéicos tais como proteínas que se combinam ao DNA (LORETI et al., 2001).

Para ativar as vias de transdução de sinais, os açúcares têm que ser primeiramente detectados. Dessa forma, para estudar as respostas a açúcares e seus análogos têm sido aplicados *in vitro* em plântulas, tecidos e protoplastos ou culturas celulares.

Com essa ferramenta, dois mecanismos de sinalização por açúcar foram propostos: hexoquinase (HXK)-dependente e independente, sendo a hexoquinase a enzima responsável pela fosforilação de hexoses no primeiro passo da via glicolítica. Na sinalização dependente de HXK, essa enzima parece ativar diretamente uma cascata de sinalização. Por outro lado, na sinalização independente de HXK, a expressão gênica é regulada diretamente por dissacarídeos, sacarose ou trealose (SMEEKENS, 2000; ROLLAND et al., 2002) (Figura 4).

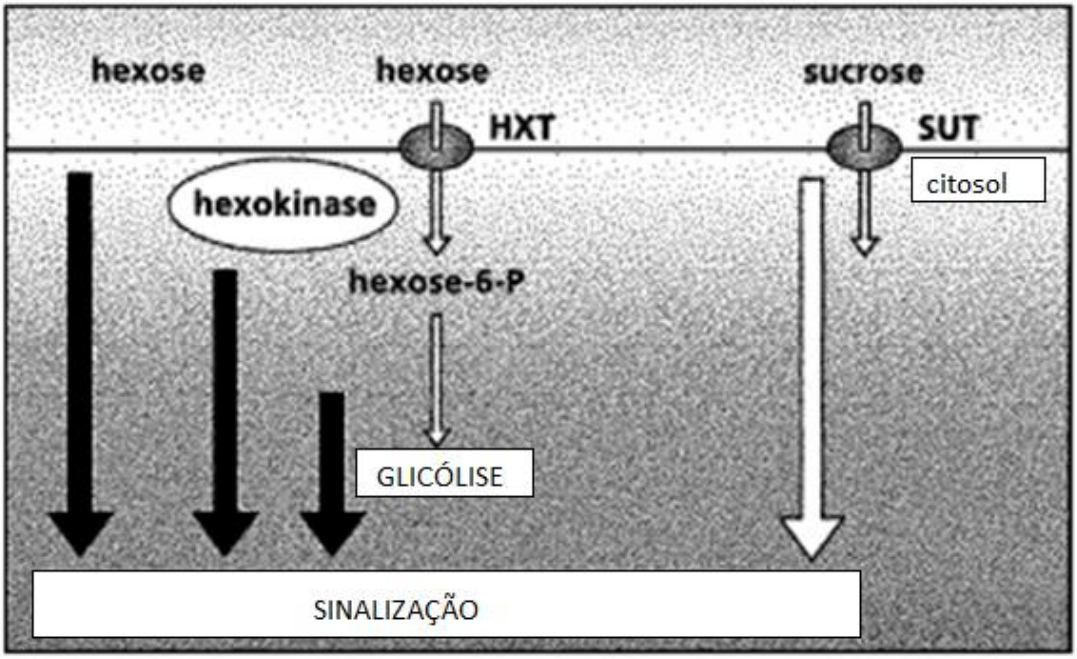


Figura 4- Tipos de sinalização de açúcares: dependentes e independentes de hexoquinase. Adaptado (SMEEKENS, 2002)

O complexo de Sinalização AtHXK1 de genes fotossintéticos, dependentes da concentração de glicose, foi recentemente determinado como ilustra a Figura 5. (BOLOURI-MOGHADDAM et al., 2010) .

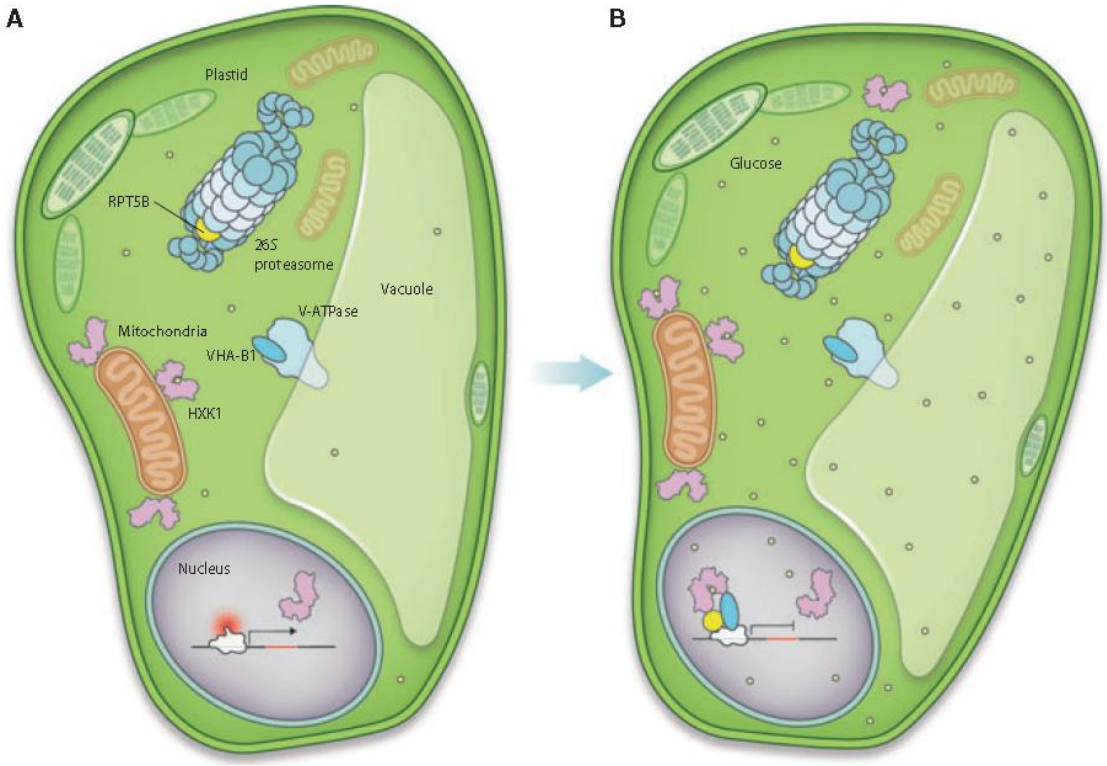


Figura 5- O complexo de sinalização AtHXK1 desencadeia a expressão de genes fotossintéticos em *Arabidopsis,* dependendo da concentração de glicose. (A) quando a glicose é baixa (pontos brancos), os genes alvos fotossintéticos são ligados por um fator de transcrição específico (branco). Esta ativação pode envolver um complexo coativador não identificado. (B) quando a glicose está em excesso (por exemplo, sob condições de deficiência de nitrato, ou condições de estresse quando as invertases são ou não ativadas, a glicose não é utilizada nas células), a glicose difunde livremente dentro do núcleo onde se combina com a AtHXK1 nuclear. A combinação de glicose desencadeia uma mudança conformacional na AtHXK1, que então age junto com VHA-B1 (azul) e RPT5B (amarela) como um repressor transcricional. Ambos a VHA-B1 e RPT5B interagem com os fatores de transcrição, ligando então a AtHXK1 ao DNA combinando e suprimindo a expressão gênica. Os mecanismos de translocação nuclear da AtHXK1, VHA-B1 e RPT5B é ainda desconhecido. (BOLOURI-MOGHADDAM et al., 2010)

Como exemplo de estudos relacionados à sinalização enzimática já foi possível evidenciar a ação da sinalização de açúcares dependente de hexokinase na repressão enzimática da frutano exohidrolase em *Lolium perene,* baseado em um ensaio de sinalização exógena (LOTHIER et al., 2010). Outro exemplo recente foi observado no estudo de uma linhagem celular de plantas trangênicas para acúmulo de sacarose, e a relação deste acúmulo com a expressão de enzimas da via metabólica de síntese e acúmulo de sacarose e suas características fisiológicas (WU e BIRCH, 2010).

Diversas pesquisas tentam elucidar como os metabólitos são reconhecidos pelas plantas. Experimentos demonstraram claramente que tanto a glicose quanto a sacarose causam uma resposta nas células, porém o que não se sabe é se esses metabólitos são reconhecidos por si só ou não (revisado por HALFORD e PAUL, 2003).

Neste contexto, a falta de carbono (CONTENTO et al., 2004; THIMM et al., 2004) e a adição de açúcar (BLÄSING *et al*., 2005; PRICE *et al*., 2004; THUM *et al*., 2004) modificam a expressão de centenas de genes (ROLLAND *et al*., 2006). A diminuição da concentração de carbono induz genes que atuam na gliconeogênese e na mobilização de compostos armazenados (HO *et al*.,2001; KOCH, 1996; RYLOTT *et al*., 2003). Os principais açúcares tais como glicose, sacarose e frutose, induzem genes de síntese de polissacarídeos, lipídios e proteínas e reprimem genes relacionados à fotossíntese (KOCH, 1996; PAUL and FOYER, 2001; STITT and KRAPP, 1999). A glicose e a sacarose encontram-se como os açúcares melhor estudados, atuando como sinalizadores e promovendo mudanças na expressão gênica em plantas (JANG and SHEN, 1994 e STITT et al., 2007).

A relação da sinalização de açúcares em cana-de-açúcar e seus aspectos evolutivos foram explorados no trabalho de BRANCO, 2008; em que se relacionou o perfil de expressão gênica entre mudas de *Saccharum ssp.* e Arabidopsis, em resposta à tratamento de glicose e sacarose e seus aspectos filogenéticos.

O papel das moléculas de açúcar como efetores da relação fonte-dreno em cana-de-açúcar já foi estabelecida (MCCORMICK et al., 2008a). A existência de uma relação robusta entre tecidos de fonte e dreno em cana-de-açúcar poderia representar um potencial fator limitante fundamental para o acúmulo de sacarose no colmo e conseqüentemente possui um papel principal nos estudos relacionados ao melhoramento de cana-de-açúcar (MCCORMICK et al., 2008b).

Em ensaios de variação do fotoperiodo visando aumentar a força de armazenamento, concluiu-se que o aumento desta força é correlacionado com um decréscimo na disponibilidade de assimilação da fonte, que em resposta pode atuar para regular a capacidade fotossintética da fonte (MCCORMICK et al., 2008c).

Em outro ensaio recente já se elucidou o complemento de açúcares solúveis presentes nos entrenós em cana-de-açúcar utilizando GC-MS (GLASSOP et al., 2010), mas ainda falta elucidar esse aspecto em relação as folhas, bem como

relacionar esses dados dentre os tecidos por causa das relações fonte-dreno entre a folha e o entrenó que é crucial para o entendimento a respeito do acúmulo de sacarose em cana.

3.3.2 Sinalização por sacarose em plantas

A sacarose é o principal carboidrato transportado nas plantas, no entanto, apenas mais recentemente surgiram evidências do papel deste açúcar como sinalizador molecular (para um resumo de suas funções sinalizadoras, Figura 6). Como revisado por BRANCO, (2008); atualmente, sabe-se que a sinalização por este açúcar é realizada por vias independentes da HXK1. Tais vias ainda são desconhecidas, porém alguns transportadores de sacarose poderiam atuar como receptores (CHIOU and BUSH, 1998). Além disso, é possível que algumas SNFs quinases também estejam envolvidas nessa via de sinalização (PURCELL et al., 1998; TIESSEN et al., 2003). Foi identificado no trabalho de ZHENG et al., 2012 que a proteína SnRK2.6 é intermediária na regulação do metabolismo da sacarose no crescimento em Arabidopsis.

Sabe-se também que a sacarose atua como regulador específico na transcrição de alguns genes, como patatina de batata (atividade de lipase e de estocagem de proteínas) (JEFFERSON et al., 1990; WENZLER et al., 1989), genes esses não regulados na presença dos produtos de quebra da sacarose, glicose e frutose (WENZLER et al., 1989; JEFFERSON et al., 1990; CIERESZKO et al., 2001). A sacarose reprime um gene transportador de sacarose do tipo próton-simporte em beterraba (CHIOU e BUSH, 1998).

Experimentos com açúcares análogos não metabolizáveis da sacarose, como palatinose e turanose mostraram sinalização independente de metabolismo: os genes do transportador de hexose VvHT1 em videira, da α-amilase no embrião de cevada e de ADP-glicose pirofosforilase em batata têm sua expressão afetada na presença desses análogos (LORETI et al 2000; ATANASSOVA et al., 2003; TIESSEN et al., 2003).

A regulação pós- transcricional do fator de transcrição *ATB2,* também é realizada pela sacarose, ela ocorre na tradução onde elevadas concentrações de sacarose reprimem a tradução do RNAm de *ATB2* (WIESE et al., 2004). Assim, o fator de transcrição *ATB2* é o primeiro gene conhecido cuja tradução é reprimida.

Este fator de transcrição ainda está envolvido na integração entre os metabolismos de carbono e nitrogênio, através da regulação dos genes ASN1 (Asparagina sintetase 1), enzima que sintetiza asparagina e glutamato, e ProDH2 (prolina desidrogenase), que degrada prolina, ambos negativamente regulados pela sacarose. Asparagina e glutamina servem como carregadores de nitrogênio nas plantas (SIECIECHOWICZ, 1998), estabelecendo assim uma ligação do fator de transcrição *ATB2* de *Arabidopsis thaliana* na sinalização por açúcar, níveis de aminoácidos e utilização de nitrogênio em plantas (HANSON et al., 2007). Em Arabdopsis a tradução do mRNA bZiP11 é regulado especificamente por sacarose (ROOK et al., 1998). Mais recentemente, foi determinada uma relação entre o bZiP11 na reprogramação do metabolismo de Arabidopsis e na regulação do metabolismo da trealose (MA et al., 2011).

Em um apanhado mais recente do que foi determinado a respeito do papel sinalizador da sacarose, têm-se evidências genéticas de que a sacarose é um regulador global das respostas à falta de fosfato em Arabisdopsis (LEI et al., 2011a e 2011b). Outro trabalho interessante determinou que a sacarose indúz a ativação rápida da CfSaPk, uma mitogen activated kinase, em células em suspensão de Cephalostachyum fuchiassun Gamble (LI et al., 2012).

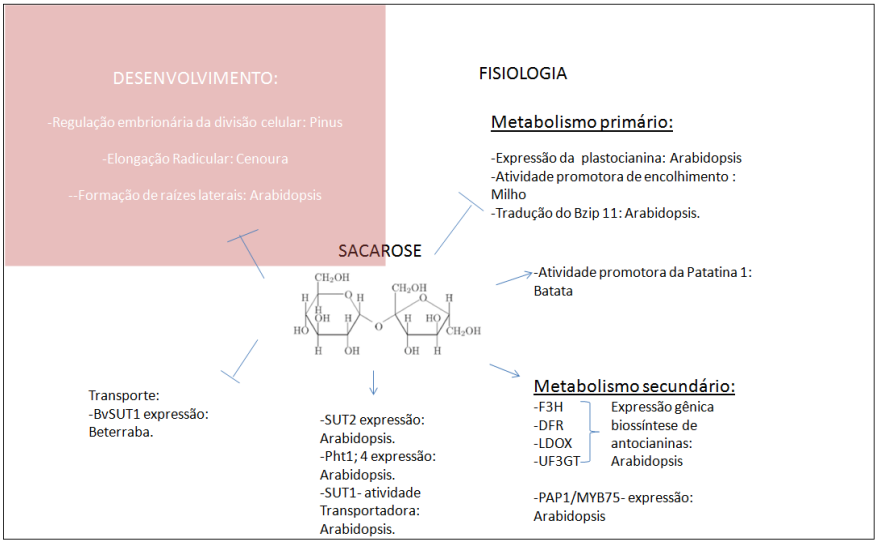


Figura 6 - Resumo dos impactos da sinalização de sacarose na fisiologia e no desenvolvimento das plantas. Adaptado (WIND et al., 2010)

3.3.3 Sinalização por glicose em plantas

A glicose é uma das moléculas centrais no desempenho de funções de sinalização celular e atua em muitos organismos, como por exemplo: *E. coli,* fungos, humanos e plantas. Como revisado por BRANCO, (2008) os diversos mecanismos moleculares que envolvem sensores e sinalização por glicose, bem como ativação/repressão transcricional mediada por esse açúcar vêm sendo amplamente estudados em microrganismos unicelulares (STULKE and HILLEN, 1999; JOHNSTON and KIM, 2005; MORENO et al., 2005; SANTANGELO, 2006).

Além do papel essencial desempenhado pela glicose na expressão de genes, na fisiologia, desenvolvimento, metabolismo, proliferação e morte celular programada, os mecanismos moleculares envolvidos nas vias de sinalização deste açúcar permanecem imprecisos em plantas e animais (ROLLAND *et al*., 2006; DANIAL *et al*., 2003; WILSON., 2003; DENTIN *et al*., 2004).

Sabe-se que as plantas possuem, pelo menos, três vias de sinalização por glicose (ROLLAND *et al*., 2006; XIAO *et al*., 2000): uma em que a hexoquinase-1 é o sensor e outras duas em que a hexoquinase-1 não está envolvida (independente de hexoquinase 1). Numa destas duas vias independentes de HXK1, a fosforilação da glicose é necessária (no qual o metabolismo da glicose é requerido) enquanto a outra é independente da fosforilação da glicose (ZHOU *et al.*, 1998; CHENG *et al.*, 2002; ROLLAND *et al.*, 2002; LEÓN and SHEEN, 2003; YANAGISAWA *et al.*, 2003; GIBSON, 2005; OSUNA *et al*, 2007) . Dessa forma, notamos que a HXK1 não apenas catalisa a fosforilação dependente de ATP da glicose, mas também atua como sensor dos níveis de glicose e como sensor do status de fosforilação da glicose, transmitindo esta informação ao núcleo através de uma via de transdução. Através da análise de mutantes *gin2* (*glucose insensitive2*), deficiente na codificação do gene da HXK1, foi possível separar as atividades catalíticas e de sensibilidade ao sinal glicose apresentados por esta enzima (MOORE et al., 2003). Em *Arabidopsis thaliana* existem dois genes de *HXK* e quatro genes *HXK-like*, que interagem não apenas entre eles para a formação de dímeros, mas também com outras proteínas e com várias membranas celulares (FROMMER *et al*., 2003). As isoformas de HXK têm sido encontradas no citoplasma celular, em associação com o retículo endoplasmático e com a membrana plasmática, mas também podem ser localizadas na membrana externa e no estroma do cloroplasto, no núcleo e em mitocôndrias

(TRAVIS *et al*., 1999; GIESE *et al*., 2005), A HXK mitocondrial foi relacionada com a regulação de morte celular programada, dando indícios da ligação entre o metabolismo da glicose e apoptose (KIM *et al*., 2006). Cho *et al*. (2006) apresentaram evidências que HXK1 forma complexos apenas no núcleo com VHA-B1 (vacuolar H+-ATPase B1) e com RPT5B (uma partícula 19S da subunidade proteossômica), para interagir com o promotor do gene *CAB2*, reprimindo sua expressão em resposta a glicose. Recentemente foi determinado o papel das hexoquinases de arroz OsHXK5 e OsHXK6 como sensores de glicose (CHO et al., 2009), em outro trabalho do mesmo grupo determinou-se que baixos níveis de glicose desacoplam a sinalização dependente de HXK1 (CHO et al., 2010).

Análises genéticas em *Arabidopsis thaliana* evidenciaram uma interação entre a sinalização por glicose e ABA, e glicose e etileno (ROOK et al., 2006; PRICE et al., 2004), indicando a existência de uma complexa rede de interação entre glicose e hormônios. No trabalho de MATIOLLI et al., 2011 determinou-se que o gene bZIP AtbZIP63 de Arabidopsis é um integrador sensível de sinais transitórios de glicose e ABA.

3.3.4 Sinalização por frutose em plantas

A frutose é um importante carboidrato encontrado no organismo humano e na maioria das plantas, tendo sido isolada pela primeira vez em 1847 a partir da cana-de-açúcar (WANG e VAN EYS, 1981).

Tanto em animais quanto em plantas os papéis no desenvolvimento e funções regulatórias de outras hexoses além da glicose permanecem desconhecidos. No entanto, nos últimos anos, a frutose na dieta de mamíferos está relacionada com a sinalização de perturbação celular e síndromes metabólicas, tais como, resistência à insulina, obesidade, diabetes tipo 2 e alta pressão no sangue (RUTLEDGE e ADELI, 2007; WEI et al., 2007).

As trioses fosfatases sintetizadas por atividade fotossintética são armazenadas como amido transitório nos cloroplastos ou convertidos em sacarose no citoplasma através de uma série de reações enzimáticas desencadeadas pela Frutose 1-6 Bisfosfatase, UDP- glicose pirofosforilase, Sacarose Fosfato Sintase e Sacarose Fosfatase (ROLLAND et al., 2006). A sacarose é então armazenada nos vacúolos, ou clivada em glicose e frutose por invertases, ou UDP-glicose e frutose

pela sacarose sintase (KOCH, 2004). Assim, seguida da hidrólise da sacarose a frutose se torna uma das mais prevalentes hexoses nas plantas e seu possível papel sinalizador tem sido proposto na literatura (PEGO e SMEEKENS, 2000). No entanto, o papel sinalizador da frutose nas plantas permanece inexplorado. Um exemplo dessa possível atividade sinalizadora é o trabalho de KATO-NOGUCHI et al., 2005 que demonstraram que o análogo de frutose psicose induziu a inibição do crescimento em raízes de alface.

Além disso, a Frutoquinase (FRK), que realiza a mesma função catalítica que a HXK, mas com a frutose como substrato ao invés da glicose, foi a primeira enzima de frutose a ser estudada por seu papel regulatório na sinalização de frutose. (ODANAKA et al., 2002; GERMAN et al., 2003; PEGO e SMEEKENS, 2000). Entretanto, apesar da FRK estar envolvida na modulação do crescimento da planta o seu papel regulatório na sinalização da frutose foi descartado (DAI et al., 2002). Portanto, pouco se sabe a respeito da sinalização da frutose e seus papéis regulatórios.

Em um estudo recente, foi identificado o FRUCTOSE INSENSITIVE 1, como um fator regulatório indispensável na via de sinalização da frutose que atua junto com a Frutose 1-6 bisfosfatase, e ainda, no mesmo trabalho demonstrou-se que a frutose está relacionada com a modulação do desenvolvimento precoce de mudas de Arabidopsis e interage com ABA e etileno (CHO e YOO, 2011). (Figura 7).

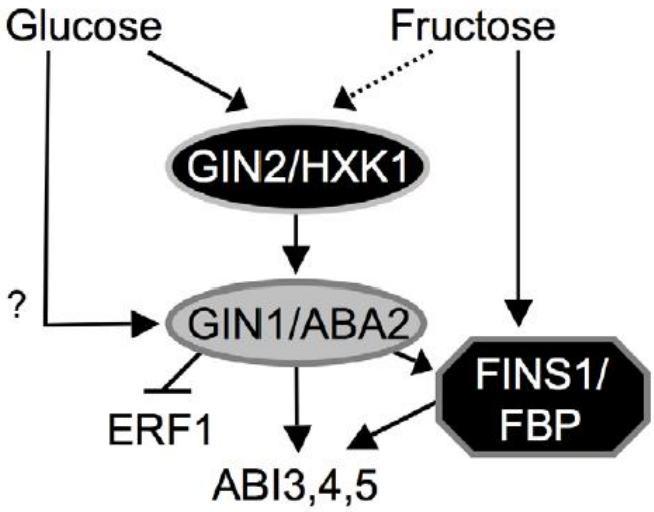


Figura 7- Modelo de sinalização de hexoses durante o desenvolvimento precoce de mudas de *A. thaliana.* A sinalização de HXK1/GIN2-dependentes de glicose agem upstream GIN1/ABA2, enquanto FINS1/FBP funciona downstream à GIN1/ABA2. A sinalização por glicose pode também integrar na GIN1/ABA2 diretamente. Apenas uma porção menor de sinalização por frutose, pode ocorrer via GIN2/HXK1. Ambos os sinais de hexoses modulam positivamente e negativamente as respostas de ABA e etileno respectivamente. CHO e YOO, 2011

3.3.5 Sinalização por manose em plantas

A manose é um monômero de açúcar de uma série de aldohexoses de carboidratos. A manose é um C2 epímero de glicose. Ela é importante no metabolismo humano, especialmente na glicosilação de algumas proteínas. Muitas das desordens congênitas de glicosilação estão associadas com mutações nas enzimas envolvidas no metabolismo da manose (FREEZE e SHARMA, 2010). É fosforilada pela hexoquinase (HXK), à manose-6-fosfato, que entra lentamente no ciclo glicolítico (SMEEKENS, 2000), causando inclusive a repressão da produção de glicose 6-P e redução de ATP (KLEIN and STITT, 1998), podendo inclusive reprimir a expressão de genes relacionados com a fotossíntese (JANG and SHEEN, 1994).

Em plantas, nos primeiros estudos relacionando a manose como possível substrato para processos enzimáticos em plantas, foi freqüentemente retratada como um metabólito inativo e seus efeitos, bem como de seus análogos estruturais, 2-desoxyglicose e glucosamina, foram descritos como adversos, inibitórios, ou tóxicos. Apesar destes efeitos inibitórios, a manose é componente de muitos produtos das plantas incluindo polímeros de carboidratos, glicoproteínas e glicolipídeos (HEROLD e LEWIS, 1977).

Neste mesmo trabalho de HEROLD E LEWIS, (1977) foram agregadas muitas informações sobre estudos a respeito da manose e seus análogos em plantas, inclusive os primeiros estudos com tratamento exógeno em soluções de açúcares, e evidências bibliográficas de um possível papel metabólico da manose na síntese de sacarose e amido além da atuação sob frutanos e polissacarídeos estruturais, germinação e crescimento, em cevada, tabaco, leguminosas e em milho. Anteriormente estes pesquisadores já haviam afirmado que a manose atua como sequestradora de ortofosfato citoplasmático e demonstraram seu efeito diferencial na síntese de amido fotossintético em plantas C3 e C4 (HEROLD et al., 1976). E que a manose aplicada exógenamente em folhas leva ao declínio da capacidade fotossintética do tecido devido à essa capacidade sequestradora (HEROLD et al., 1981).

Trabalhos posteriores retratam outros aspectos da manose em plantas, em 1986 um trabalho com ensaios de tratamento exógeno de manose em folhas de milho, em que resultou na redução em 50% nas trocas de carbono parcialmente reversível pela adição de ortofosfato (HARRIS et al., 1986). Evidenciou-se também

que o metabolismo da manose nas folhas de milho não atuou como recurso para a síntese de sacarose e amido (HARRIS et al., 1986). Em 1999 evidenciou-se o papel da manose na inibição da germinação de Arabidopsis mediado por hexoquinases via redução energética (PEGO et al., 1999).

Um trabalho mais recente dos poucos encontrados evidenciou que a manose atua na pertubação da actina do citoesqueleto das folhas de Arabidopsis, ao contrário da glicose e da sacarose, apresentando um papel de influência negativa e estrutural (BANÁS et al., 2010).

Está clara a necessidade de estudos mais aprofundados a respeito do papel sinalizador e metabólico da manose em folhas e com o advento das técnicas de biologia de sistemas, expressão gênica e metabolismo; será possível obter informações mais concretas a fim de chegar a maiores conclusões a respeito de suas funções.

3.4 Metabolismos potenciais para o estudo de sinalização de açúcares

Enzimas componentes do metabolismo de carboidratos: glicólise e gliconeogênese

A glicólise é uma rota central quase universal do catabolismo da glicose, a rota com o maior fluxo de carbono na maioria das células. A quebra glicolítica de glicose é a única fonte de energia metabólica em alguns tecidos de mamíferos e tipos celulares (hemácias, medula renal, cérebro e esperma, por exemplo). Alguns tecidos de plantas que são diferenciados para armazenar amido (como os tubérculos da batata) e algumas plantas aquáticas derivam a maior parte de sua energia da glicólise; muitos microorganismos anaeróbicos são inteiramente dependentes da glicólise (NELSON E COX, 2005).

Em plantas jovens, gorduras e proteínas armazenadas são convertidas, através de rotas que incluem a gliconeogênese, no dissacarídeo sacarose para transporte através da planta em desenvolvimento. A glicose e seus derivados são precursores da síntese das paredes celulares das plantas, nucleotídeos e coenzimas, e uma variedade de outros metabólitos essenciais. (NELSON E COX, 2005).

O processo de gliconeogênese superpõe-se ao da glicólise, sendo que, iniciando pelo piruvato, a maioria das reações de síntese de glicose, são no sentido inverso aos da glicólise. As enzimas envolvidas na catalização desses passos são reguladas para que, ou glicólise, ou gliconeogênese predomine, dependendo das condições fisiológicas (NELSON E COX, 2005). A maioria das etapas da gliconeogênese usa as mesmas enzimas que catalizam o processo da glicólise, porém, o fluxo de carbonos, é na direção reversa. Entretanto, em três pontos as reações da glicólise são irreversíveis *in vivo* (por liberarem energia livre em forma de calor): conversão de glicose em glicose 6-fosfato pela hexoquinase, a fosforilação da frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bisfosfato pela fosfofrutoquinase-1 e a conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato pela piruvato quinase (NELSON E COX, 2005). Para contornar essas barreiras energéticas, reações e enzimas especiais são necessárias (NELSON E COX, 2005). As principais reações da glicólise e gluconeogênese estão esquematizadas na Figura 8.

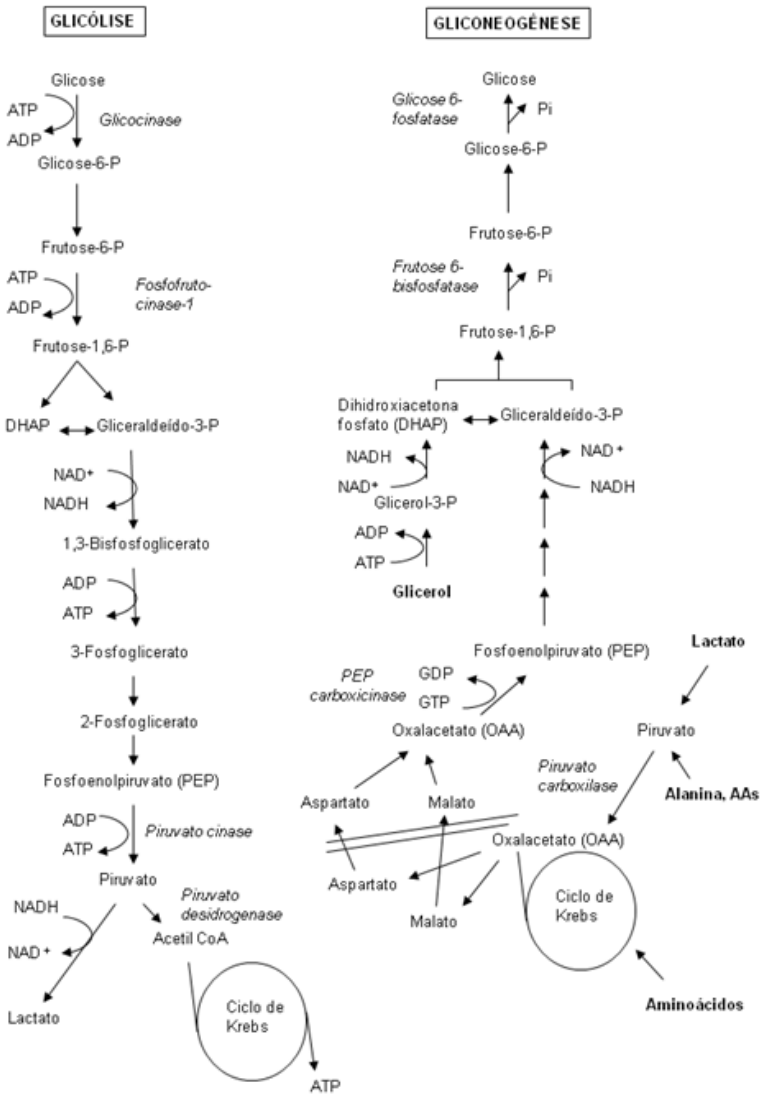


Figura 8 - Esquema demonstrando as principais reações de glicólise e gliconeogênese em plantas ADAPTADO NELSON E COX 2005

Transportadores de açúcares

Proteínas transportadoras de açúcares possuem papel fundamental nas vias de fornecimento de carbono regulando o transporte de assimilados de carbono pela membrana, bem como sua distribuição pela planta, (MCCORMICK, 2007). O carregamento da sacarose pode ocorrer via simplasto, apesar do fato de que a sacarose é normalmente liberada a partir das células fonte do mesófilo e ativamente fornecida a partir do espaço apopástico para o floema (HELLMAN et al., 2000; WILLIAMS et al., 2000). Os simportadores da membrana plasmática, sacarose-H^+ são fundamentais para este processo. O descarregamento de sacarose pode

também ocorrer via uma rota simplástica ou apoplástica, que é usualmente espécie-específica e pode depender do estádio de desenvolvimento dos órgãos e tecidos (WILLIAMS et al., 2000). Na via apoplástica, o parênquima de dreno pode tanto importar a sacarose diretamente do apoplasto via simportadores sacarose H^+, ou alternativamente como hexoses via co-transportadores monossacarídeo-H^+ após a hidrólise da sacarose por invertases de parede celular.

Transportadores de açúcares são categorizados em dois tipos de famílias, transportadores de monossacarídeos (MST) e dissacarídeos (DST), como várias formas existentes em cada família. Além disso, dependendo da espécie, cada transportador pode ser expresso em diferentes estádios de desenvolvimento sob condições ambientais variáveis em diferentes tecidos (WILLIAMS et al., 2000).

Geralmente os DSTs são altamente específicos para sacarose, sendo que alguns podem transportar maltose (LEMOINE, 2000). MSTs por outro lado, apresentam uma ampla especificidade de substratos, transportando hexoses e pentoses (BÜTTNER e SAUER, 2000, HELLMAN et al., 2000). Foram identificados MSTs para diferentes substratos tais como, D-glicose, 3-o-metilglicose, 2-desoxi-D-glicose, D-manose, e D-frutose (para revisão HELLMAN et al., 2000).

Metabolismo da trealose

Um papel importante na via metabólica da trealose na regulação de um sistema independente de HXK foi proposto (EASTMOND et al., 2002; PAUL e PELLNY, 2003; PAUL, 2007) e foi refutado recentemente por ITURRIAGA et al., 2009 que demonstrou que o gene Trealose 6-Fosfato Sintase possui sinalização via HXK (Figura 9) . Anteriormente, a via da trealose não era considerada universal em todas as espécies de plantas (GODDIJN e SMEEKENS, 1998). Uma razão para esse fato pode ser por que os metabólitos de trealose são encontrados em pequenas quantidades em espécies além de plantas, nas quais o seu acúmulo em altos níveis proporciona proteção contra estresse hídrico (WINGLER, 2002). Além disso, pela dificuldade de se detectar a trealose em trabalhos anteriores, foi sugerido que a maioria das plantas superiores havia perdido a capacidade de produzir trealose (CROWE et al., 1992). No entanto, a atividade da trealase, uma enzima responsável pela quebra da trealose em glicose, foi evidenciada por estar presente

em numerosas plantas (MÜLLER et al., 2001). Aplicações subseqüentes de um inibidor de trealase demonstraram com sucesso níveis detectáveis de trealose tanto em tabaco como em batata (GODDIJN et al., 1997).

Tal como a sacarose, a trealose é tipicamente produzida em um processo com dois passos. Primeiramente, a síntese da trealose-6-fosfato (T6P) a partir da UDP-glicose e G6P é catalizada por trealose 6 fosfato sintase (TPS; EC: 2.4.1.15). T6P é então desfosforilada à trealose por trealose 6 fosfato fosfatase (T6PP; EC: 3.1.3.12) (ROLLAND et al., 2006). Genes funcionais que codificam a TPS e T6PP foram detectados em *Arabidopis* (BLÁZQUEZ et al., 1998, VOGEL et al., 1998; VOGEL et al., 2001).

O papel regulatório da via da trealose na sinalização de açúcares está agora sendo estudada em diversas plantas. Em *Arabidopsis,* aplicações externas ou até mesmo pequenas concentrações de trealose resultou em mudanças fisiológicas significativas, tais como, a inibição da elongação das raízes (WINGLER et al., 2000). Plantas transgênicas de tabaco, em estudos prévios, as quais expressavam os genes otsA e otsB de *E. Coli*, codificando TPS e T6PP respectivamente, produziu efeitos consistentes com o impacto na sinalização de açúcares (PAUL et al., 2001). Alterações controladas dos níveis de T6P pelas combinações de expressão dos genes do metabolismo de trealose em *E. coli* demonstraram que a T6P é indispensável para a utilização de carboidratos para o crescimento em *Arabidopsis* (SCHLUEPMANN et al., 2003). Os mecanismos exatos pelos quais a T6P influencia o metabolismo do carbono ainda não estão claros, visto que diferentemente das leveduras, a T6P não é um inibidor da atividade da HXK (EASTMOND et al., 2002). Isso indica que a T6P pode estar envolvida em uma via de sinalização de açúcares independente de HXK (EASTMOND et al., 2003), no entanto a via completa não é independente de HXK como verificado por ITURRIAGA et al., 2009.

Outro estudo interessante foi a identificação e isolamento de um único sistema gênico para a produção de trealose. No fungo basidiomiceto, *Grifola frondosa,* a trealose pode ser sintetizada diretamente a partir da glicose e glicose-1-fosfato por uma nova trealose sintase (SAITO et al., 1998; ZHANG e ZHENG, 1999). A transferência do gene de tabaco para cana-de-açúcar resultou em plantas com altos níveis de trealose e exibiram aumento na tolerância à seca e estresses

osmóticos (ZHANG et al., 2005; ZHANG et al., 2006). A cana-de-açúcar transgênica, não apresentou mudanças morfológicas óbvias e não houve inibição do crescimento em campo, embora tenha exibido uma alta tolerância à seca e melhor rendimento sob condições de seca (ZHANG et al., 2006). Ao passo que os efeitos fisiológicos exatos da trealose neste sistema são desconhecidos, estes resultados demonstram que a cana-de-açúcar pode tolerar altas concentrações de trealose. O que levanta questionamentos a respeito da sensibilidade do sistema de sinalização da trealose em diferentes espécies de plantas.

Apesar dos mecanismos da regulação da trealose e T6P em plantas superiores requerer mais investigações, é possível que a T6P perturbe o fluxo glicolítico de carbono e o balanço de nitrogênio implicado na regulação da fotossíntese na folha (PAUL e PELLNY, 2003; PAUL, 2007). Outros estudos também demonstraram que o gene da TPS é requerido durante a embriogênese, onde aparentemente permite aos embriões de *Arabidopsis* a responder a sacarose (EASTMOND et al., 2002). Estas descobertas implicam que a via da trealose possui um papel interessante na sinalização de açúcares.

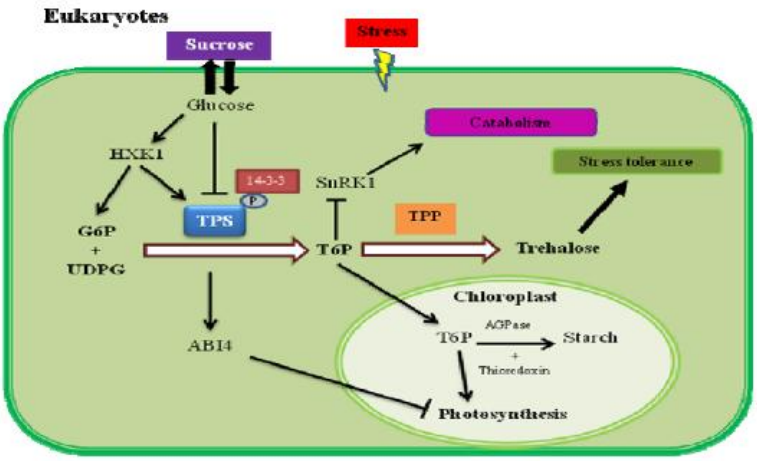


Figura 9 - Metabolismo da Trealose ITURRIAGA et al., 2009

A família SNF1 (*sucrose non fermenting-1)* em leveduras e animais

As leveduras tais como a *Saccharomyces cerevisae* são organismos anaeróbicos facultativos, mas que mesmo na presença de oxigênio, preferem a fermentação de açúcares como a glicose, frutose e sacarose para uma respiração com maior eficiência energética. Assim, as leveduras desenvolveram um completo arranjo de caminhos de sensibilidade e sinalização para permitir uma utilização

otimizada e exclusiva de suas fontes de carbono, sendo que a regulação da expressão gênica em resposta aos níveis de açúcar é um importante mecanismo para o controle do metabolismo de carboidratos em leveduras (PURCELL et al., 1998).

O gene SNF1 corresponde à totalidade da família SNF1 em *S. cerevisae.* É expresso em resposta a baixos níveis de glicose, além de ser requerido para que praticamente todos os genes reprimidos por este açúcar sejam expressos, inclusive aqueles necessários para o crescimento em fontes alternativas de carbono. Está também envolvido na esporulação, acumulação de glicogênio e biogênese de peroxissomos. A proteína SNF1 possui peso de 72 kDa com um domínio quinase serina/treonina N-terminal e um domínio regulatório C-terminal.

O ortólogo da proteína quinase SNF1 em mamíferos é a proteína quinase AMPK (*AMP-activated protein kinase*), que atuaria no monitoramento e conservação de ATP, fosforilando e inativando enzimas metabólicas consumidoras de ATP como acetil-CoA-carboxilase (envolvida na síntese de ácidos graxos) e HMG-CoA redutase (envolvida na síntese de isoprenóides/esteróides) (revisado por HALFORD E HARDIE, 1998).

A família SnRK (*SNF-1 related protein kinase*) em plantas

As plantas possuem um grupo de proteínas quinases relacionadas às *SNF1* (*sucrose non fermenting 1*) de leveduras. Halford e Hardie (1998) propuseram o nome *SNF1-related kinase* (*SnRK*) para este grupo de proteínas em plantas, além de identificar sua divisão em 3 subgrupos: *SnRK1*, *SnRK2* e *SnRK3*, sendo esses dois últimos compostos por proteínas identificadas apenas em plantas (HALFORD et al., 2009).

As *SnRK1* são as reguladoras globais do metabolismo do carbono em plantas, atuando por fosforilação direta em proteínas como a sacarose fosfato sintase (SPS), inativando-a, ou pela regulação da expressão gênica sendo necessária para a expressão da sacarose sintase (Susy) (HALFORD et al., 2009; PURCELL et al., 1998). Além disso, a partir da sinalização associada ao déficit de energia, seja a partir de falta de nutrientes ou luminosidade a SnRK1 desencadeia mudanças transcricionais extensas que reconstituem a homeostase, promovem a

sobrevivência da célula e elaboram respostas a longo prazo para adaptação, crescimento e desenvolvimento (BAENA-GONZÁLEZ E SHEEN, 2008).

As plantas apresentam ainda duas outras subfamílias maiores e mais diversas (HALFORD et al., 2003) de proteínas quinases similares às *SnRK1* nesta região (HALFORD E HARDIE, 1998). As *SnRK2* englobam proteínas de aproximadamente 40kDa, com uma região C-terminal rica em aminoácidos ácidos. A proteína *PKABA1* de trigo foi a primeira a ser clonada (ANDERBERG, 1992) e está envolvida em mudanças na expressão gênica mediada por ABA (HALFORD et al., 2009).

A terceira subfamília de proteínas quinases *SnRK3*, apresenta membros com mesmo peso molecular das *SnRK1* (58 kDa), apesar de não apresentarem similaridade alguma em sua região C-terminal (HALFORD e Hardie, 1998).

Trealose e SNRK *(SNF related Kinase)*

A trealose-6-fosfato emergiu como uma poderosa molécula sinalizadora em plantas, um de seus alvos, foi identificado como SnRk1 pertencente ao grupo de proteínas quinases SNF1/AMPK (ZHANG et al., 2009, PAUL et al., 2010 MARTINEZ-BARAJAS et al., 2011). Este açúcar inibe a SnRK de todos os tecidos em plantas já testados exceto para folhas maduras. Isso pode ser explicado através do requerimento de um fator intermediário presente em tecidos em crescimento, mas não em folhas maduras e é consistente com a visão de que a trealose-6-fosfato promove os processos anabólicos associados com os tecidos em crescimento (ZHANG et al., 2009).

Enquanto a trealose 6 fosfato promove o crescimento em presença de sacarose (ZHANG et al., 2009, PAUL et al., 2010), ela inibe o crescimento em presença de trealose (SCHULEPMANN et al., 2004).

A atividade da SNRK1 foi proposta de ser inativada por açúcares, (BAENA-GONZÁLEZ et al., 2007), consistente com a observação de que o aumento de sacarose causa um aumento de concentrações de trealose 6 fosfato (SCHULEPMANN et al., 2003, LUNN , 2003), o que subsequentemente inibe a atividade da SNRK1, promovendo o crescimento.

A ligação entre SNRK1 e T6P é significativa, pois estabelece T6P como um metabólito sinalizador integrando o metabolismo de carbono com a atividade das enzimas e reprogramação da expressão gênica controlada por esta proteína quinase (ZHANG et al., 2009, PAUL et al., 2010). É mutio provável, portanto, que o crescimento desencadeado por trealose através da SNRK1 (MCCORMICK, 2007).

Assim, muitos trabalhos vêm buscando relacionar o metabolismo da trealose com a sinalização do gene SNRK (DELATTE et al., 2011, MARTÍNEZ-BARAJAS et al., 2011 e ITURRIAGA et al., 2009 (Figura 9).

Síntese de sacarose

O ponto principal de início da síntese da sacarose é a glicose ativada, UDP-glicose. A síntese de dissacarídeos em geral acontece através de um intermediário monossacarídeo ativado pela adição de um grupo nucleotídeo. A UDP-glicose utilizada na síntese de sacarose é derivada da glicose -1- fosfato, que é derivada de produtos fotossintéticos (Figura 10).

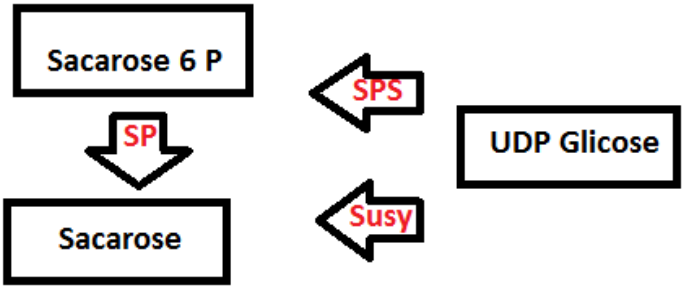


Figura 10 - Síntese da sacarose a partir da UDP glicose e suas 3 enzimas principais: SPS, SP e SUSY

Sacarose fosfato sintase e sacarose fosfatase

O primeiro passo da via de síntese de sacarose inicia-se com F6P e UDP-glicose enquanto a SPS catalisa a síntese de sacarose-6-P (S6P), que é então irreversivelmente hidrolizada a Pi e então reciclado de volta ao cloroplasto para o fornecimento contínuo de triose-P para o citosol (LUNN e AP REES, 1990). Com a rápida remoção de sacarose-6-P por uma fosfatase específica de alta atividade ela desloca a reação reversível da SPS do equilíbrio *in vivo* (STITT et al., 1987). A atividade da SPS é vista como contribuinte para o controle do fluxo da sacarose

(FERNIE et al., 2002). A expressão da SPS é regulada por sinais do desenvolvimento, ambientais e nutricionais e por fim em alguns casos, em nível transcricional (WINTER e HUBER, 2000). E ainda demonstrou-se que a atividade da SPS é inversamente proporcional à síntese de amido (SILVIUS et al., 1979, HUBER e ISREAL, 1982), e então a SPS pode também ter um papel inadvertido na regulação da formação do amido (KERR et al., 1984, FERNIE et al., 2002).

A expressão de genes codificantes para SPS em milho e cana-de-açúcar é dependente de luz e regulada durante o desenvolvimento (CHENG et al., 1996; SUGIHARTO et al., 1997), enquanto a atividade da enzima foi demonstrada ser fosforilada por múltiplas proteínas serina quinases e fosfatases, em uma variedade de espécies (LUNN e FURBANK, 1997; WINTER e HUBER, 2000; LUNN e MAC RAE, 2003). A sua fosforilação foi implicada na produção diurna de SPS ambas em soja (*Glicine Max L.)* e tomate (*Licopersicon esculenton Mill*), apesar dos períodos de flutuações se diferenciarem das espécies (KERR et al., 1985; JONES e ORT, 1997). E ainda há evidência baseada em um sítio combinante da SP na SPS, para uma associação entre SPS e SP (sendo complexo SPS-SP putativo) que pode envolver a canalização da S6P (ECHEVERRIA et al., 1997; LUNN et al., 2000). Um próximo complexo entre SPS e UDP-glicose pirofosfatase (UGPAse Ec 2.7.7.9) foi também sugerida (TOROSER et al., 1998; WINTER e HUBER, 2000). No entanto, a composição, atividade e regulação de tais complexos permanecem a serem determinados (LUNN e MAC RAE, 2003).

Até então existem dois tipos de proteínas quinases relacionadas à SPS, uma SNF1-related protein Kinase (SNRK1) que é nomeada assim, devido a sua alta similaridade à SNF1 (Sucrose non Fermenting) de leveduras, e uma calmodulina-like protein kinase (CPDK) (WINTER e HUBER, 2000). Em um estudo detalhado por Huang e Huber (2001) demosntrou que a SPS de dicotiledôneas é primariamente ativada por uma SNRK1 e uma CDPK que poderiam fosforilar a SPS de monocotiledôneas. Estudos com transgênicos revelaram que uma SPS de milho expressado em tomate era ativa (WORRELL et al., 1991). No entanto, em plantas transgênicas similares de tabaco eram capazes de fosforilar a SPS de milho, mas as proteínas de tomate não. Isto pode ser um indicativo da importância de outros resíduos de aminoácidos sob o sítio de fosforilação e pelo menos alguma especificidade de reconhecimento dos sítios da SPS por proteínas SPS quinases

(MCCORMICK, 2007). Em espinafre (*Spinacia oleracia L.*) as proteínas quinases SPS foram evidenciadas a serem fortemente inibidas pela G6P, enquanto as SPS quinases de folhas de milho foram reportadas por serem estritamente dependentes de Ca2+, sugerindo que mudanças no Ca2+ citosólico podem estar envolvidas na via de transdução sinal (MCMICHAEL et al., 1995). A fosforilação de um único sítio de serina na SPS também foi reportada em folhas de espinafre sob estresse osmótico (HUBER e HUBER, 1992).

Exames mais recentes da complexidade de expressão das diferentes isoformas da SPS em espécies únicas (KOMATSU et al., 1999; LANGENKAMPER et al., 2002, CHEN et al., 2005) revelaram a necessidade de reexaminar certas interpretações prévias das enzimas, devido a afirmação de que a atividade e os níveis de expressão da SPS fosse uniforme. Sabe-se que pelo menos três famílias de SPS existem, em monocotiledôneas, dicotiledôneas e divisões para cada família, e é predito que pelo menos um membro de cada família é expresso em uma planta individualmente, apesar do fato de que uma das isoformas pode prevalecer (LUNN e MC RAE, 2003). Por exemplo, um trabalho realizado por WORRELL et al., 1991 demonstrou que a SPS de milho é pouco provável a ser sub-regulada por fosforilação de proteínas se esta provém de uma família diferente na forma predominante nas espécies alvo. Por conseguinte, várias espécies demonstraram expressar pelo menos duas formas da SP (LUNN et al., 2000; LUNN , 2003), apesar das razões para tal multiplicidade permanecerem a serem descobertas (Revisado por MCCORMICK, 2007).

Sacarose sintase

Diversas revisões recentes discutem a hipótese de que o metabolismo da sacarose está no coração de um sistema sensitivo e regulador do desenvolvimento das plantas, tais como a sacarose e seus constituintes (glicose e frutose) atuam não apenas como substratos no metabolismo de carbono, porém como moléculas sinalizadoras para a regulação de diversos aspectos do metabolismo primário das plantas e crescimento (LORETI et al., 2001, ROLLAND et al., 2002; KOCH;,2004; GIBSON, 2005) conforme MCCORMICK, 2007. Neste caso, então o controle desses sistemas iniciará com a síntese e degradação de sacarose pode proceder por uma ou duas vias enzimáticas. A reação invertase não-reversível (Ec: 3.2.1.26) produz

glicose e frutose via hidrólise de sacarose. Alternativamente, a quebra da sacarose em frutose e uridina disfosfato-glicose (UDP-glic) pode ser catalisada por Sacarose Sintase (SUSY Ec: 2.4.1.13). A diferença entre essas duas reações é significativa, como quebra por invertases comparativamente produz duas vezes mais hexoses, enquanto os produtos da SUSY iniciam os poucos sinais baseados em hexoses (WOBUS e WEBER, 1999; KOCH, 2004), tais sinais podem ser detrimentais em tecidos circundando diferenciação, maturação, e a SUSY demonstrou predominar sob a invertase durante tais estádios no desenvolvimento do órgão (KING et al., 1997; WOBUS e WEBER, 1999; FERNIE e WILLMITZER, 2002). A reação da SUSY é irreversível e há clara evidência de tratamento de açúcares com açúcares marcados que ambas as vias da SPS e SUSY contribuem para a síntese de sacarose (GEIGENBERGER e STITT, 1991). É sugerido que a operação combinada destas vias com a via de degradação da invertase permite a célula a responder sensitivamente a ambas as variações no fornecimento de sacarose e a demanda celular de carbono aos processos biossintéticos (GEIGENBERGER et al., 1997).

O papel crucial da SUSY na partição de carbono foi demonstrado em várias espécies, incluindo batata, cenoura (*Dacus carota L.)*, algodão (*Gossypium hirsutum L.*) e cana-de-açúcar (ZRENNER et al., 1995; D´AOUST et al., 1996; STURM e TANG, 1999; BOTHA e BLACK, 2000; RUAN et al., 2003). A SUSY está relacionada a vários importantes processos fisiológicos incluindo a síntese do amido (NGUYEN-QWOC e FOYER, 2001), síntese de parede celular (DÉJARDIN et al., 1997; CHOUREY et al., 1998), relações de fonte e dreno das plantas (ZRENNER et al., 1995), carregamento do floema e descarregamento (HÄNGGI e FLEMMING, 2001) e anoxia (RICARD et al., 1998). Em relação ao carregamento e descarregamento do floema, a SUSY demonstrou operar eficientemente sob condições de baixa concentração de oxigênio comparado com a invertase (ZENG et al., 1998).

Além disso, evidências recentes com batatas transgênicas indicaram que a mudança durante o desenvolvimento na quebra da sacarose pela SUSY em tubérculos em crescimento é beneficiada no balanço de adenilato, biossíntese de amido e custos respiratórios (BOLOGA et al., 2003). Além disso, a significância funcional da SUSY como oposta à invertases é provavelmente importante nas condições de pouco oxigênio nos drenos em crescimento, o que pode ajudar a

conservar o uso da adenilato através da produção de UDGP ao invés de hexoses, comparado com as invertases que utilizam-se de ATP.

A importância regulatória da SUSY, sua atividade na síntese de sacarose em folhas em entrenós jovens de cana-de-açúcar foi discutido em modificado por (BOTHA e BLACK, 2000; SCHAFER et al., 2004), entretanto, a função regulatória da SUSY em tecidos mais velhos não foi ainda examinada por completo. Devido à correlação entre atividades ótimas da SUSY, bem como invertases ácidas durante a elongação dos entrenós, ambas as enzimas são prováveis de estarem envolvidas no processo de elongação e crescimento (LINGLE, 1999).

Um papel adicional da SUSY no carregamento e descarregamento do floema foi inicialmente baseado nas observações consistentes da localização da expressão da SUSY em células maduras do floema em tecidos das folhas (NOLTE e KOCH, 1993). Apesar de um relato por HÃNGGI E FLEMMING (2001), no qual se concluiu que há uma exclusão específica do acúmulo de transcritos e proteínas de tecidos de dreno (floema) de folhas jovens de milho, em trabalhos mais recentes imunolocalizou-se a enzima de elementos do tubo da seiva, bem como as células companheiras (WÄTCHER et al., 2003). Observou-se a SUSY em proximidade com a membrana plasmática do tubo de seiva e uma ATPase específica do floema, a qual pode mediar o transporte e compartimentalização da sacarose (WACHTER et al., 2003). Além disso, é favorecida sob condições de anoxia em tecidos de floema (VAN DONGIN et al., 2003).

Até então, 3 isoformas do gene SUSY foram identificadas em monocotiledônias e em dicotiledôneas (FU et al., 1995; HUANG et al., 1996). Estes genes possuem expressões diferenciais e temporais (KOCH; 2004) são diferencialmente regulados à níveis transcricionais e traducionais e provavelmente possuem diferentes funções metabólicas (FU et al., 1995, CHOUREY et al., 1998; DÉJARDIN et al., 1997). A expressão pode variar de acordo com o tipo de tecido e o estado metabólico do carboidrato (WINTER e HUBER, 2000). A isoforma da SUSY de milho Sh1, por exemplo, é maximamente expresso sob condições limitantes de carboidratos (0,2% comparado à 2% de glicose), onde a expressão da SUS1 é induzida por aumento das concentrações de glicose (HELLMAN et al., 2000). A Sh1 também responde prontamente à baixos níveis de O_2 com marcantes aumentos em

ambos os níveis de mRNA e atividade enzimática especialmente sob condições de depleção modesta de oxigênio (ex. 3% oxigênio) (ZENG et al., 1998).

No recente trabalho de VERMA et al., 2010, realizou-se um estudo funcional das enzimas SPS e SUSY em cana-de-açúcar, e indicou-se a possibilidade de utilização destas enzimas para o melhoramento dirigido de cana-de-açúcar através de sua superexpressão utilizando transgenia.

3.5 Biologia sistêmica: estudos integrados de genômica, transcriptômica e metabolômica

Em análises de biologia de sistemas, o entendimento da coordenação dos processos nos organismos vivos tornou-se possível na era pós-genômica, onde as informações sobre genomas completos tornaram-se disponíveis. Por meio da integração das informações obtidas através dos trabalhos em genômica, com a atividade gênica considerada nos estudos de transcriptômica e os níveis internos de compostos orgânicos obtidos através da metabolômica, a regulação coordenada dos processos apresenta-se como uma rede de influências sinérgicas direcionadas (HOEFGEN e NIKIFOROVA, 2008).

O estabelecimento de técnicas de montagem de perfis metabólicos durante a última década completa a análise de um organismo biológico como um sistema complexo, com as técnicas de genômica, transcriptômica e proteômica bem estabelecidas. (STEINHAUSER e KOPKA 2007).

Uma nova área de pesquisa que tem sido desenvolvida no estudo de plantas, mas ainda não muito explorada em cana-de-açúcar é a Metabolômica. Os estudos em Metabolômica visam à identificação e quantificação de todos os metabólitos presentes em um dado sistema biológico (FIEHN, 2002). Metabólitos são os produtos finais derivados a partir de diferenças nas sequências de DNA, controle da expressão gênica, tradução em proteínas e atividade enzimática e, portanto, são marcadores fenotípicos potenciais e podem auxiliar no entendimento de importantes aspectos agronomicamente importantes (GLASSOP et al., 2007).

A identificação desses metabólitos pode ser alcançada utilizando técnicas tais como, espectrometria de massas, ou ressonância nuclear magnética (NMR) (WARD

et al., 2007). Ambas as tecnologias possuem vantagens e, portanto, são complementares. (PAN e RAFTERY,2007).

Existem duas metodologias principais que podem ser abordadas em metabolômica: abordagem direcionada e não direcionada. (SAWADA et al.,2008). A diferença principal entre essas abordagens é que a abordagem direcionada deverá considerar apenas os compostos metabólicos que são descritos para o sistema biológico de interesse e a não direcionada, considera todos os sinais obtidos como um possível metabólito, por isso necessita a interpretação de seus dados.

A utilidade das informações do metaboloma para a reconstrução da funcionalidade de um organismo a nível sistêmico tem sido bem ilustrada em biologia de plantas na plataforma de ensaios utilizando Cromatografia gasosa e Espectrometria de Massa que foi a primeira a ser estabelecida e mais bem desenvolvida. (BINO et al., 2004; HALL et al., 2002; KOPKA et al., 2004; SCHAUER e FERNIE 2006).

As análises integradas entre perfis metabólicos e de expressão gênica são reconhecidas atualmente como uma poderosa ferramenta para a biotecnologia (FERNIE et al., 2005) e é um novo atributo auxiliar na busca por associações funcionais entre genes e metabólitos.

Em cana-de-açúcar, alguns trabalhos utilizando técnicas de metabolômica, foram realizados de modo a elucidar os mecanismos envolvidos com o acúmulo de sacarose em entrenós em diferentes estádios de desenvolvimento (BOSCH, et al., 2003; GLASSOP et al., 2007). Nesse estudo identificaram-se metabólitos particulares em uma abordagem não direcionada que estariam relacionados com os níveis de sacarose. Em outros trabalhos, direcionados, estudou-se o metabolismo da trealose relacionando com o metabolismo de carbono em entrenós de cana-de-açúcar (BOSCH, 2005) e a influência de hexoses-fosfato e ciclagem do carbono em entrenós (VAN DER MEWE, 2005).

Foi desenvolvido recentemente o primeiro modelo metabólico em escala genômica para o estudo de metabolismo de plantas C4 o C4GEM, de modo que seja possível relacionar os dados obtidos em ensaios de biologia de sistemas para simular e predizer modelos metabólicos utilizando milho, cana-de-açúcar e sorgo (DAL´MOLIN et al., 2010).

No entanto esses estudos estão em fase embrionária em relação ao que pode ser estudado a fim de se compreender o metabolismo de sacarose em cana-de-

açúcar. Sendo os próximos passos a serem tomados, seriam analisar o perfil metabólico de outros tecidos além do colmo, que estariam envolvidos na síntese e acúmulo de sacarose, e relacionar os perfis de expressão gênica com os perfis metabólicos obtidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foram utilizadas plantas pertencentes à variedade SP 80-3280. As plantas foram coletadas em campo experimental, fornecidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira CTC- Piracicaba-SP.

As coletas foram realizadas em 2 etapas:

1ª etapa- 4 meses: Coletadas em dezembro 2010.

2ª etapa – 12 meses: Coletadas em abril de 2011.

4.2 Ensaios de sinalização de açúcares

4.2.1 Estabelecimento da metodologia de ensaio de sinalização exógena de açúcares

Para estabelecer uma metodologia i para realizar os ensaios exógenos, foi considerado o fato de que o material deveria ser preservado de modo que não oxidasse para os posteriores ensaios de extração de RNA e qPCR.

Para tal as ponteiras foram coletadas no campo e imediatamente as folhas 1+ (folhas mais fotossinteticamente ativas) foram coletadas e tratadas seguindo o modelo das fotos na Figura 11 por 3 horas sob luz intensa 250 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ com as concentrações moleculares de açúcar à 25mM, 50 mM e 100mM; o açúcar utilizado para esse ensaio foi a manose, por não estar presente no cromatograma de folhas de cana-de-açúcar, e o controle com água em triplicata biológica. Após o tratamento as folhas foram congeladas em N_2 líquido, maceradas, e para 1 g de tecido macerado foi incubado em 30 mL de H_2O miliQ à 80º C por 1 hora. Depois, essa solução foi diluída em 200 mL de água e filtrada a vácuo para a extração dos carboidratos.

A solução de carboidratos foi analisada utilizando-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com o sistema DIONEX DX-500, utilizando colunas DIONEX CarboPac PA1 de 5mm, determinando-se, então a concentração das soluções a serem utilizadas no presente projeto.

4.2.2 Ensaios de sinalização extracelular

Amostras de folhas de 4 e 12 meses foram cortadas sob água e transferidas para frascos de vidros de 30 mL contendo soluções de açúcares. Os tratamentos foram adaptados a partir do que foi descrito para arroz (HO et al., 2001) e citrus (LI et al., 2003). Assim as folhas 1+ foram imediatamente mantidas em tubos de vidro com 30 mL, contendo as soluções: água, sacarose, glicose, manose, manitol e 3-O-Metilglicose, sob iluminação~ 200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ e ventilação por 3 horas, coletadas sempre às 8h00 com o ensaio durando até as 11h00 nos três dias de cada etapa (Figura 11). Para que não houvesse diferença de osmolaridade, todos os açúcares foram aplicados na mesma concentração de 50 mM, estabelecido pelo ensaio prévio utilizando HPLC.

Para contextualizar os tratamentos, é importante mencionar que a sacarose pode ser reconhecida diretamente como dissacarídeo (frutose+glicose) ou ser quebrada via um processo enzimático, sendo como potenciais sinalizadores os monossacarídeos glicose e/ou frutose, ambos substratos de proteínas quinases como a hexoquinase e frutoquinase. Assim, para distinguir os efeitos da sacarose e de seus metabólitos é importante avaliar principalmente o efeito da glicose na indução da expressão gênica, pois a frutose é um substrato pobre para a hexoquinase devido à sua baixa afinidade.

Já para avaliar se os efeitos da glicose são dependentes da via da hexoquinase, foram usados os açúcares não metabolizáveis: 3-O-Metilglicose, um análogo da glicose que não é fosforilado pela hexoquinase (CORTES et al., 2003), e a manose que é um epímero da glicose e é fosforilada pela hexoquinase (HXK), à manose-6-fosfato, que entra lentamente no ciclo glicolítico (SMEEKENS, 2000), causando inclusive a repressão da produção de glicose 6-P e a redução de ATP (KLEIN and STITT, 1998), podendo inclusive reprimir a expressão de genes relacionados com a fotossíntese (JANG and SHEEN, 1994).

Por outro lado, uma vez que a indução pelos açúcares pode ser devida a um componente osmótico foi utilizado como controle osmótico o açúcar manitol (STOOP et al, 1996), pelo fato de que este apresenta-se como um “soluto compatível” ao estresse osmótico. Assim, se a expressão dos genes for diferencial a esses controles significa que a alteração na expressão do gene é via sinalização de

açúcares e não osmótica. Porém se esses sinais apresentarem sobreposição em taxas semelhantes de expressão, o fator osmótico é considerável.

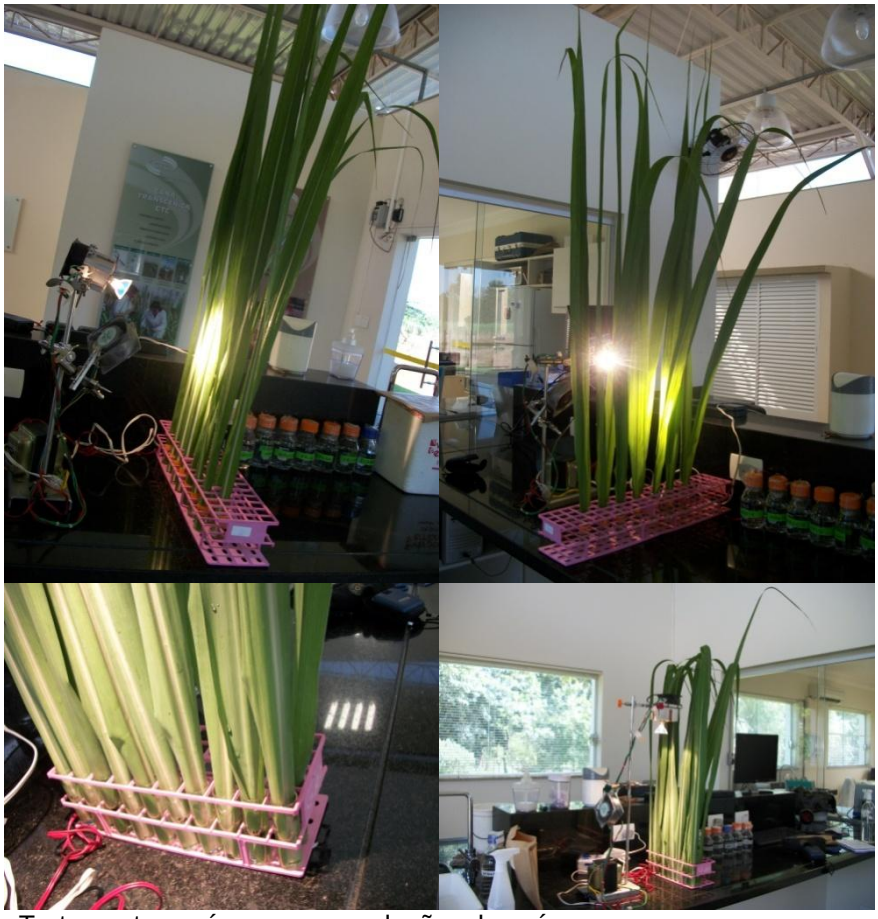


Figura 11 - Tratamentos exógenos com soluções de açúcares

O material foi congelado em N_2 líquido e armazenado a –80°C. Os tratamentos foram realizados em triplicatas biológicas.

4.3 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada segundo o método desenvolvido por ZENG E YANG (2002) a partir de 1g de tecido de folhas 1+ de cana de açúcar. O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido, ao qual adicionou-se 10mL de tampão de extração pré-aquecido a 65ºC. A mistura após homogeneização foi mantida por 15 minutos a 65ºC, sendo agitados a cada 5 minutos. Em seguida, procedeu-se a adição de um volume de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 24:1, respectivamente). A amostra foi homogeneizada e centrifugada a 1.000 x *g*, durante 8 minutos. A fase superior aquosa foi transferida para um novo tubo, repetindo-se a extração com CIA mais duas vezes, sendo a última

centrifugação feita durante 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 0,25 volumes de 10M LiCl para precipitação do RNA total. Após homogeneização, as amostras foram mantidas durante 16 horas, a 4º C. Após centrifugação (16.000 x g) durante 30 minutos, a 4º C, os *pellets* de RNA total resultantes, foram lavados três vezes com etanol 75% (v/v), secos à temperatura ambiente durante 10 minutos e ressuspendidos em 110 µL de água com DEPC 0.1%.

4.3.1 Quantificação e determinação da pureza do RNA extraído

As amostras de RNA foram avaliadas quanto à pureza e quantificadas em espectrofotômetro (Hitachi U3300) em dois comprimentos de onda, 260nm e 280nm. A razão entre as absorbâncias (A_{260nm}/A_{280nm}), foi utilizada como uma medida da qualidade das amostras. Valores entre 1,6 a 2,0 indicam boa qualidade de RNA extraído. Já a absorbância a 260 nm (A_{260nm}) foi utilizada para a quantificação do RNA total extraído segundo a fórmula (Figura 12):

$$[RNA] = \frac{A_{260nm} \times F_c \times F_d}{1000}$$

Figura 12 – Fórmula para o cálculo da concentração de RNA (µg μL^{-1}). A_{260nm} absorbância a 260 nm, F_c: fator de conversão que indica a equivalência de uma unidade de absorbância no comprimento de onda de 260 nm correspondente a 40 µg $RNA.mL^{-1}$. F_d é o fator de diluição da amotra. O valor final é dividido por 1000 para expressar a unidade de concentração de RNA em µg μL^{-1}. Fonte: Sambrook et al (1989)

4.3.2 Isolamento do RNA mensageiro e síntese de cDNA

Alíquotas de 50 µg de RNA total armazenadas em freezer a -80º C foram utilizadas para a purificação de seus respectivos RNAm. O isolamento do RNAm, foi realizado com o auxílio do *kit Dynabeads® mRNA purification* (Invitrogen), que se baseia em uma separação magnética. Microesferas contendo Oligo $(dT)_{25}$ em sua superfície que capturam e purificam RNA poliadenilado. Outros RNAs desprovidos de cauda poli-A e DNA genômico são imediatamente eliminados.

Cada 200 µL de microesferas são capazes de purificar 75 µg de RNA total, produzindo até 2 µg de RNAm. Assim, conduziram-se duas purificações de 50 µg de cada material de acordo com as instruções do fabricante. O RNAm purificado de

cada 50 µg de RNA total foi ressuspendido em 17,5 µL de água tratada com 0.1% de DEPC. As duas purificações foram agrupadas totalizando 35µL.

A fita de cDNA de cada gene (Tabela 2) foi sintetizada com o auxílio do *kit* SuperScript™ One-Step RT-PCR Platinum® *Taq* (Invitogen), em uma mistura de reação contendo 6,25 µL de Tampão 2X concentrado (contendo 0,4 mM de cada dNTP e 2,4 mM de $MgSO_2$), 1,25 µL de cada *primer* (400 nM), 0,25 µL de RT/Platinum®*Taq* e 3,5 µL de RNAm, totalizando 12,5 µL de volume final. Os tubos com as misturas de reação foram colocados em um termociclador com a seguinte programação: 1 ciclo de 50ºC por 30 minutos e 94ºC por 2 minutos para síntese de cDNA e pré-desnaturação da enzima transcriptase reversa; e 10 ciclos de 94ºC durante 45 segundos, 55ºC , 57ºC e 60ºC dependendo do *primer* durante 1 minuto e 72ºC durante 2 minutos e 30 segundos para amplificação dos fragmentos.

4.4 Desenho de primers

Os genes selecionados foram baseados no trabalho de MCCORMICK 2008b no qual através de análises de expressão gênica utilizando *microarrays,* após ensaio de reversão fonte-dreno em folhas de cana-de-açúcar com 12 meses, identificou genes diferencialmente expressos em diversas rotas do metabolismo de cana de açúcar, dentre elas a sinalização de açúcares. Assim, os genes do presente ensaio foram selecionados através da classificação metabólica do KEGG, 2010 por estarem relacionados às vias de crescimento da planta e síntese e acúmulo de sacarose, e posteriormente buscados por seus SAS (*Sugarcane Assembled Sequences*) no banco do SUCEST, para o desenho das sequências (Tabela 1):

Tabela 1 - Genes selecionados a partir dos respectivos SAS (SUCEST)

Genes Alvos:	SAS (SUCEST)
Metabolismo de Carboidratos	
1-Fructose-1,6-biphosfate aldolase	SCCCCL3005E06.b
2-SNF1-related kinase complex: (AMPKBI (5'-AMP-activated protein kinase, beta subunit, complex-interacting region) domain f)	SCCCCL3001E05.b
3-Hexokinase.	SCAGAM2124E02.g
4-Pyrophosphate dependent 6-phosphofructose-1-kinase	SCCCLR2C01D10.g
5-Threalose 6 phosphate syntase	SCCCLR1070E10.g
6- Triosephosphate isomerase	SCEPRZ1009B12.g
7-Glucose-6-phosphate/phosphate-transporter	SCVPAM2063A02.g
Sinalização, Transporte e metabolismo de Fosfato inorgânico	
8- Inorganic pyrophosphatase	SCCCRZ2C03E07.g
9- Mitogen-activated protein kinase	SCEQLB2019B08.g
10- Trehalose 6-phosphate phosphatase	SCEPLR1051A07.g
11- Sugar transporter type 2a (putative)	SCQGSB1083B09.g
Síntese de Sacarose	
12- Sucrose phosphate Synthase	SCAGRT2037G07.g
13- Sucrose phosphate phosphatase	SCSBST3096E12.g
14- Sucrose Synthase 3 (Leaf-roll)	SCEPCL6023F02.g
Normalizadores	
1-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	SCCCCL2001B02.b
2- Actina	SCCCLR1069D05.g
3- Tubulina	SCJFRZ2011D04.b

Assim as seqüências dos genes foram obtidas a partir do banco SUCEST (http://sucest-fun.org/), e a partir daí determinaram-se os domínios das proteínas e a matriz de leitura aberta de maior extensão utilizando os softwares NebCutter (http://tools.neb.com/NEBcutter2/) e ORFinder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/), para seguir com o desenho dos *primers* Tabela 2. E posteriormente, checou-se a especificidade dos *primers* obtidos através do algoritimo Blastn contra o banco do SUCEST e NCBI respectivamente.

Os *primers* específicos foram desenhados usando-se o software *Primer 3 Versão 4.0* (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/), e a análise para checarmos a existência de dímeros nesses primers foi analisada com auxílio da ferramenta *Oligo Analysis*

Tool disponível no web site da *Operon* (http://www.operon.com/technical/toolkit.aspx).

Tabela 2 - Sequência dos *primers desenhados para os ensaios de qPCR*

GENE	FWD	REV	TM °C
FRUCTOSE-1,6-BIPHOSFATE ALDOLASE	GGTGGCAGAGAAAGTGTGGT	TGAGCATTGTTAGCGTGTGC	57
SNF1-RELATED KINASE COMPLEX:	ATCCACCAACCACCACTCTC	CACTTGCCCTCTTTCATCAG	55
HEXOKINASE	TGGGGGTTCCTGATACTTCTC	TTTGTCTTTGCCCAGCTTCT	57
PYROPHOSPHATE DEPENDENT 6-PHOSPHOFRUCTOSE-1-KINASE	TGGCATTGGTGTTGTGAAG	TTGTCCTTGAGCCGTTTCTC	55
6-THREALOSE 6 PHOSPHATE SYNTASE	GTATCGGAGGACGGAGAACC	GGCGAACCACCTACTCAGC	57
GAPDH	GCAGCCTTGTCCTTGTCAGT	CCGTCAACGACCCCTTCAT	57
ACTINA	GTCCTCTTCCAGCCTTCCTT	GCCACCACCTTGATTTTCAT	55
TUBULINA	TCCTCCTCTTCTTCCTCCTCG	CTCCACATTCATCGGCAACTC	57
TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE	AGCAGAGAGAGGCAGGAACA	GGGCTAACATTGGAGTGGAG	55
GLUCOSE-6-PHOSPHATE/PHOSPHATE-TRANSPORTER	CTGCTTTGCCTGGGAGTAGA	ATCTCGCCGCTTACATTCTC	55
INORGANIC PYROPHOSPHATASE	GCTGGAATGAGCCACAGAAT	ATGAAAACCTTGGGGGAGAG	57
MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE	TCGCAAAGGTCAGGTTCG	CGGACAACATTAGGGTGCTT	55
TREHALOSE 6-PHOSPHATE PHOSPHATASE	CCAATCTCTTCCAACCTGCT	TCTAAAACCATTCGCCCATT	55
SUGAR TRANSPORTER TYPE 2A	GAATGGCAGAGGCAAAGAAG	GAATGGCAGAGGCAAAGAAG	55
SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE	CGATGCTGAAGGAAAGCTG	CTTTGATGAGGAAGGCGAAG	60
SUCROSE PHOSPHATE PHOSPHATASE	GAGCATGGGTGGACAGACTT	CGCTTGACAGAGAGCCACACA	60
SUCROSE SYNTHASE 3 LEAF ROLL	TTTGGTCTCACTGTCGTGGA	TGATTTGGGTCTTGCTTGC	60

4.5 Quantificação da expressão gênica pela análise de PCR quantitativo

A quantificação da expressão gênica relativa dos genes alvos à expressão de um gene de referência, foi realizada através de PCR Quantitativo (qPCR) a partir do cDNA. Este método é uma combinação da técnica de PCR e fluorescência utilizando-se a *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), que contém o marcador fluorescente SYBR Green I, que se intercala à dupla fita de DNA durante a reação. Assim, a geração de um sinal fluorescente é diretamente proporcional à quantidade do produto de amplificação resultante da reação de PCR. A intensidade de fluorescência é monitorada após cada ciclo da PCR, o que possibilita a análise durante a fase exponencial da reação. Para obter resultados exatos e reproduzíveis, a eficiência da reação deve ser próxima a 100%, ou seja, a quantidade de DNA duplica após cada ciclo da fase exponencial.

4.5.1 Reações de PCR quantitativo

As reações foram preparadas com 12,5 μl de *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG*, 9,5 μl água ultrapura tratada com DEPC, 1 μl cDNA e 1 μl de cada *primer* 10mM (*forward* e *reverse*). As amostras foram feitas em triplicata e em três diluições (0,5, 10^{-1} e 10^{-2}) para possibilitar a normalização e o cálculo da eficiência do *primer*, respectivamente, a partir daí determinou-se a concentração ótima de cDNA: 10^{-2}. Foram utilizados controles para a padronização de cada reação quanto à pureza da amostra (integridade do mRNA e ausência de contaminação com DNA na amostra de mRNA).

A análise foi realizada no aparelho IQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio Rad). O perfil térmico das reações foi o seguinte: desnaturação inicial a 95ºC por 15 minutos, seguidos por 45 ciclos de 95ºC por 20 segundos, 55ºC, 57ºC e 60ºC (dependendo do gene) por 30 segundos, 72ºC por 30 segundos, seguidos de finalização com 95ºC por 30 segundos e 60ºC por 18 minutos.

A eficiência das reações foi analisada utilizando-se o programa *LinRegPCR* 11.0 (http://LinRegPCR.HFRC.nl, RAMAKERS et al., 2003).

4.5.2 Normalização dos dados obtidos pela análise de PCR quantitativo

A normalização dos resultados obtidos na quantificação da expressão gênica relativa dos genes alvos à expressão dos genes Tubulina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (ISKANDAR et al., 2004).

A quantidade de cada cDNA, relativa à quantidade do cDNA dos genes alvos e normalizadores, foi determinada por meio do programa Norm Finder (http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm) e a partir da planilha obtida através do software LinRegPCR *Calculation Matrix for PCR Efficiency*, (KARLEN et al., 2007). disponível na página http://rest.gene-quantification.info/).

4.5.3 Cálculo da expressão gênica obtida por PCR quantitativo

Os cálculos de expressão gênica obtidos no presente trabalho foram realizados através do Software REST (PFAFFL et al., 2002). Que se baseia nas seguintes fórmulas:

Concentração = Eficiência $^{(\text{CP médio dos controles} - \text{CP médio dos tratamentos})}$

$$\text{Expressão Relativa} = \frac{\textit{Concentração do gene de interesse}}{\textit{Concentração da média geométrica dos genes de Referência}}$$

$$\textit{Expressão Gênica Final} = \frac{\textit{Expressão Relativa Tratamento}}{\textit{Expressão Relativa Controle}}$$

Os resultados obtidos pelo software apresentam também uma análise de Intervalo de Confiança de 95% e um teste de hipótese, em que se determinam quais genes aumentam ou diminuem sua expressão ou os que não apresentam diferenças estatísticas significativas.

4.6 Metabolômica

4.6.1 Extração dos metabólitos

Através de uma parceria com o Prof. Thomas Moritz do Umea Plant Science Centre - Umea University- Suécia, as amostras foram enviadas em agosto 2011 para as análises de metabólitos.

Metabólitos das folhas de cana-de-açúcar foram extraídos a partir de 5 miligramas de material seco, para tanto, folhas dos diferentes tratamentos, foram maceradas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 24 horas**,** em equipamento Modulyod-230 (Thermo Scientific).

As amostras foram pesadas e armazenadas em tubos (1,5 mL). A extração foi realizada de acordo com a metodologia descrita por GULLBERG *et al,* (2004), com algumas modificações. Foi adicionado 1 mL de tampão de extração (20% clorofórmio (v/v), 20% água (v/v) e 60% metanol (v/v)), contendo 11 isótopos estáveis, como padrões internos: ($^{13}C_3$) ácido mirístico, ($^{13}C_4$) ácido hexanodecanóico, ($^{2}H_4$) ácido sucinico, ($^{13}C_5$,^{15}N) ácido glutâmico, ($^{2}H_7$) colesterol, ($^{13}C_5$) prolina, ($^{13}C4$) α-cetoglutarato, ($^{13}C_{12}$) sacarose, ($^{2}H_4$) putrescina, ($^{2}H_6$) ácido salicílico e ($^{13}C_6$)-glicose. Visando aumentar a eficiência da extração, foi adicionada uma esfera magnética de tungstênio (Retsch GmbH & Co. KG), por tubo, e as amostras foram levadas para agitador (MM 301 *vibration mill*, Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany), com freqüência de 30 Hz s^{-1}, por 3 minutos. As esferas magnéticas foram

removidas e as amostras centrifugadas por 10 minutos, 14.000 *rpm* a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi transferido para tubos (*vials)* e desses tubos, alíquotas de 50 µL, 100 µL, 200 µL foram retiradas e acondicionadas em *vial* específico para GC-MS. As amostras foram então levadas para concentrador a vácuo, à temperatura ambiente, por 2 horas.

Na etapa seguinte, as amostras foram derivatizadas. Inicialmente foram adicionado 30 µL de metoxiamina (15 mg mL^{-1}) em pirimidina, as amostras foram agitadas por 10 minutos e em seguida deixadas em repouso por 16 horas, à temperatura ambiente. A sililação[1] foi realizada com a adição de 30 µL de MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano), as amostras foram deixadas em repouso por 1 hora. Posteriormente foi adicionado 30 µL de Heptano, com 15 ng/g de metil-esterato.

As amostras foram analisadas, de acordo com GULLBERG *et al.* (2004), por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/TOF-MS). Esta esta etapa foram utilizadas também amostras controles (brancos) e uma série de alcanos (C_{12} – C_{40}), que possibilitam o cálculo dos índices de retenção (SCHAUER *et al*., 2005).

4.6.2 Cromatografia gasosa e espectrometria de massas

Um microlitro da amostra derivatizada foi automaticamente injetado, modo *split* (1:20) e *splitless*, em cromatógrafo gasoso (Agilent 7890A), equipado com coluna de a 30 m × 0.25 (J&W Scientific, Folsom, CA). A temperatura de injeção foi de 260 °C, com fluxo de 20 mL min^{-1}, iniciado após 75 s. O fluxo de gás pela coluna foi de 1 mL min^{-1}, com temperatura de 70 °C, por 2 min, aumentando 15 °C min^{-1} até 320 °C, por 4 min. O efluente da coluna foi introduzido na fonte de íons do equipamento *Pegasus HT time-of-flight mass spectrometer*, GC/TOFMS (Leco Corp., St Joseph, MI). A temperatura da fonte de íons foi de 200 °C, os íons foram gerados em um feixe de elétrons a 70-eV com corrente de ionização de 2.0 mA e, e 20-30 espectros s^{-1} (30 espectros s^{-1} run 1, 20 spectra s^{-1} run 2) foram registrados na faixa de 50-800 *m/z*. A voltagem de aceleração foi ligada após 290 s. A voltagem do detector foi de 1450-1490 V (1450V run 1, 1490 V run 2).

[1] Sililação: preparo da amostra através do deslocamento de um hidrogênio ativo, usualmente em um grupo hidroxila, por um grupo organosilil.

4.6.3 Identificação dos metabólitos e análises estatísticas

Os cromatogramas gerados, foram exportados, no formato NetCDF, para o software ChromaTOF, versão 4.32 (Leco corporation). Neste software foi realizada a identificação dos metabólitos, com base na comparação do índice de retenção e cromatograma, das amostras, com bibliotecas internas (gcms_std_100817, artefacts, maxplanck, metabolomics_081121 e mpi_public_06). Para tanto, inicialmente foi realizada a análise da série de alcanos, visando a obtenção do índice de retenção para cada possível metabólito. Durante esta análise, cada pico passível de identificação teve o seu tempo de retenção, indice de retenção e massas (de duas a três), plotados em uma tabela de Excel, as massas plotadas foram as mesmas utilizadas para a comparação dos cromatogramas. Na etapa seguinte, os dados referentes aos metabólitos identificados foram exportados para o software MatLab, versão 7.11. Neste programa foi realizado o processamento dos dados (correção da linha de base e alinhamento dos cromatogramas) e, obtenção da área calculada de cada pico. Para a execução do MatLab foi necessária a utilização de *scripts*, deste modo, foram utilizados dois *scripts*, desenvolvidos na universidade de Ümea. Inicialmente foi utilizado o *script* HDA, no qual foram adicionados os arquivos NetCDF, para identificação da série de alcanos e alinhamento. Em seguida, foi utilizado o *script* RDA_GCMS para obtenção das áreas calculadas. Com base nesses valores as análises multivariadas foram iniciadas no software SIMCA-P+ 12.0.1. A partir desses dados puderam ser desenhados alguns modelos PCA (Análise dos componentes principais) de modo a se observar a distribuição dos metabólitos identificados em relação às variáveis tratamentos e idades das plantas.

Na etapa das análises realizadas no Brasil trabalhamos com os dados utilizando diversas análises computacionais utilzando o Software R, relacionando a concentração dos metabólitos, dentre elas estão os *heat maps* por idade, nos quais é possível observar a reconfiguração dos metabólitos em resposta aos tratamentos, e o nível de concentração, indicado por intensidade de coloração. E para a identificação dos metabólitos diferenciais, foi determinado um limiar no qual os metabólitos que possuírem concentrações 30% acima, ou abaixo desse limiar são considerados diferenciais. Considerando 100% dos pontos no programa, na análise HT-Self, algorítimo desenvolvido para microarranjos de DNA, o qual deriva os limiares dependentes de intensidades e estima os testes não paramétricos de

significância. Este teste corresponde a uma alternativa para ensaios que possuem amostragem em triplicatas biológicas, o que para os testes estatísticos tradicionais é considerada uma baixa amostragem populacional (VENCIO E KOIDE, 2005).

5 RESULTADOS

5.1 Quantificação dos carboidratos e estabelecimento da concentração padrão dos ensaios de sinalização

Através das análises utilizando Cromatografia líquida, foi possível determinar se os açúcares dos tratamentos a serem empregados estavam sendo absorvidos pela folha, e se teriam o efeito desejado utilizando Manose em diferentes concentrações (25 mM, 50 mM e 100mM).

Assim, foi possível observar que a partir do tratamento com 50 mM a manose já era reconhecida no cromatograma, (em um pico coincidente com a glicose por se tratar de um epímero) e, portanto estava sendo absorvida pela folha. Dessa forma, escolheu-se a concentração de 50 mM, para os ensaios posteriores. (Figura 13).

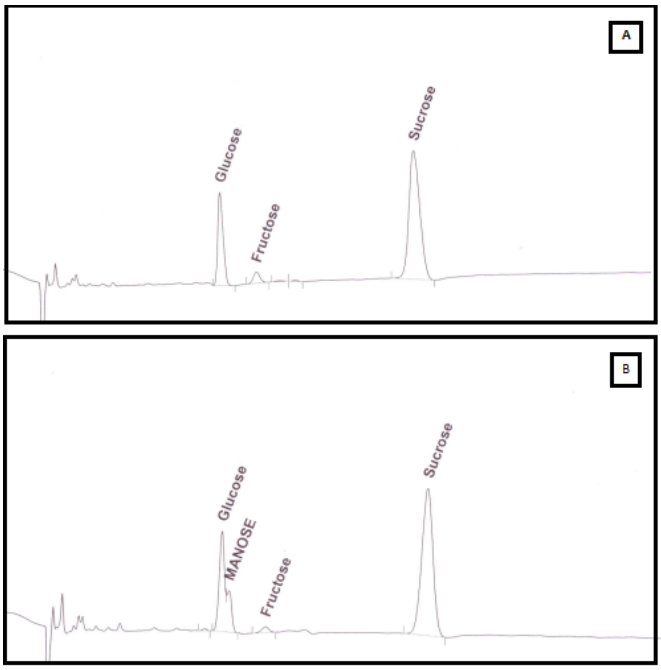


Figura 13 - Figura com os cromatogramas obtidos a partir do ensaio de HPLC para quantificação de carboidratos de folhas 1+ para amostras de folhas aos 4 meses tratadas em água (Figura A) e amostras tratadas em soluções de manose na concentração de 50 mM (Figura B)

5.2 Análises de expressão Gênica através de PCR quantitativo

Normalização do ensaio de PCR quantitativo

Para a seleção do par de genes normalizadores, utilizados como controles endógenos, utilizou-se o software NormFinder (ANDERSEN et al., 2004). Os valores de N0 obtidos, após análise de eficiência (E) no software LinRegPCR de todas as amostras em triplicatas biológicas e técnicas todos os tratamentos. Após a análise das corridas experimentais, selecionou-se o par de genes mais estáveis para serem os controles endógenos das posteriores análises de expressão. Assim dentre os 3 genes candidatos a normalizadores o par mais estável foi a Tubulina e Actina (Figura 14).

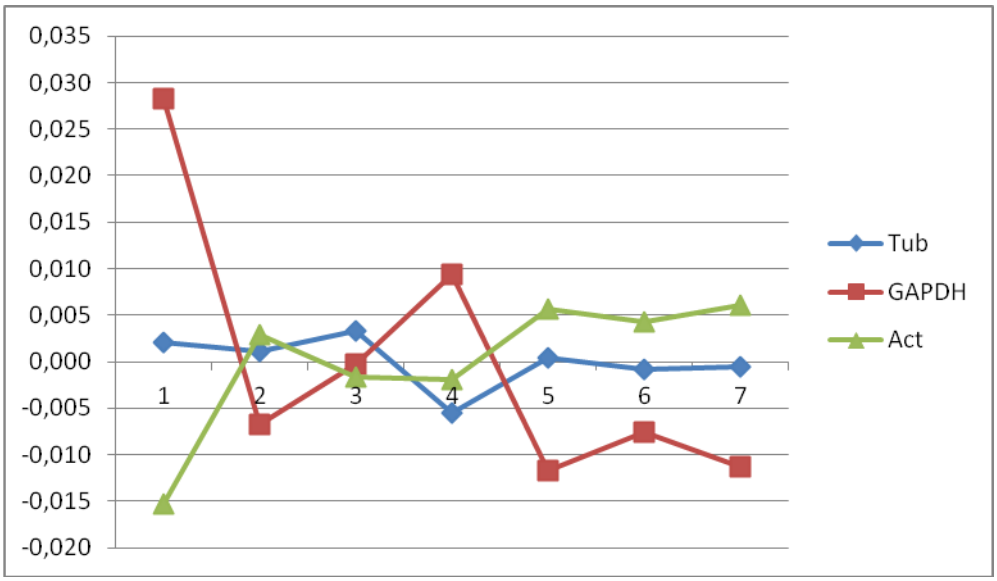


Figura 14 - Escolha dos genes normalizadores: par mais estável obtido através do software Normfinder. Eixo vertical estão os valores N0 obtidos através do LinReg PCR. Eixo horizontal nos números de 1-7 corresponde aos tratamentos: sacarose, glicose, frutose, manose, 3-o-metilglicose, manitol e água

Na Reação de qPCR foi utilizado uma diluição de cDNA de 10^{-1} para todas as amostras.

E a partir dos Cts (Threshold Cycles) obtidos após as corridas experimentais através do software LinRegPCR, as análises de Expressão Relativa foram realizadas através do Software REST (Quiagen).

Análises de expressão gênica

Expressão gênica ao longo do desenvolvimento

Na presente análise temos duas variáveis: Idade das plantas (4 meses e 12 meses) e tratamentos (5 açúcares e 2 controles). Assim de modo a obter uma visão clara do que está sendo modificado durante o desenvolvimento da planta, foram feitos dois tipos de análises.

A primeira análise de expressão gênica visou conhecer a expressão dos genes escolhidos, sem influência de tratamentos de sinalização entre 4 e 12 meses, isto é ao longo do desenvolvimento da planta. Com isso, foi calculada a Expressão Gênica Relativa comparando-se a idade de 12 meses em relação a 4 meses (tratadas com água). Os resultados foram obtidos a partir da análise comde Intervalo de Confiança de 95% e Teste de Hipótese do Software REST (Figura 15) que apresentou uma visão geral nas mudanças de expressão dos genes em questão.

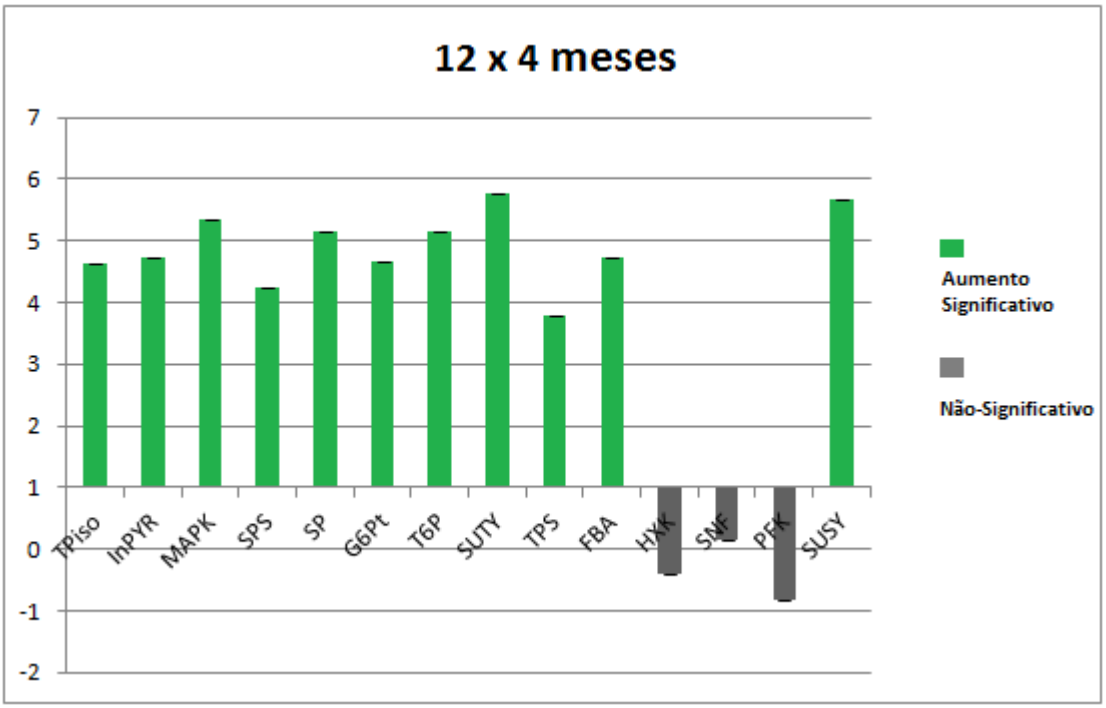


Figura 15 - Expressão relativa (em escala linear) valores do eixo vertical entre 12 e 4 meses para o tratamento água, a idade 4 meses foi considerado o controle experimental. Software: REST. Teste de hipótese e intervalo de confiança à 95%. Genes eixo horizontal: Tpiso (Triosefosfato isomerase), INPYR (Pirofosfatase Inorgânica), MAPK (Quinase ativadora de Mitose), SPS (Sacarose Fosfato Sintase), SP (Sacarose Fosfatase),(G6Pt)Transportador de Glicose 6 Fosfato, (T6P) Trealose 6 Fosfato Fosfatase, (SUTY) Transportador de Açúcar, (TPS) Trealose Fosfato Sintase, (FBA) Frutose Bisfosfato Aldolase, (HXK) hexoquinase, (SNF) proteína relacionada à sacarose não fermentadora quinase, (PFK) fosfofrutoquinase e (SUSY) Sacarose Sintase. Em verde: aumento significativo, em cinza sem mudanças significativas entre as idades

Expressão gênica e sinalização de açúcares

Análises de efeito osmótico *versus* sinalização

O primeiro desafio das análises de expressão gênica para os ensaios de sinalização de açúcares após os tratamentos escolhidos foi determinar se o efeito de sinalização em si decorreu do açúcar ou se houve efeito osmótico. Para isso, um dos tratamentos utilizados foi o açúcar manitol. Assim nas análises de Expressão Relativa posteriores foi preciso avaliar as alterações dos genes dentro dos tratamentos por idade (Figura 16). Notou-se que os genes HXK, SNF e PFK apresentaram alto efeito osmótico de repressão de expressão, e que os genes Tpiso, InPYR e FBA não apresentaram efeito algum, e sob os demais genes o efeito não foi significativo.

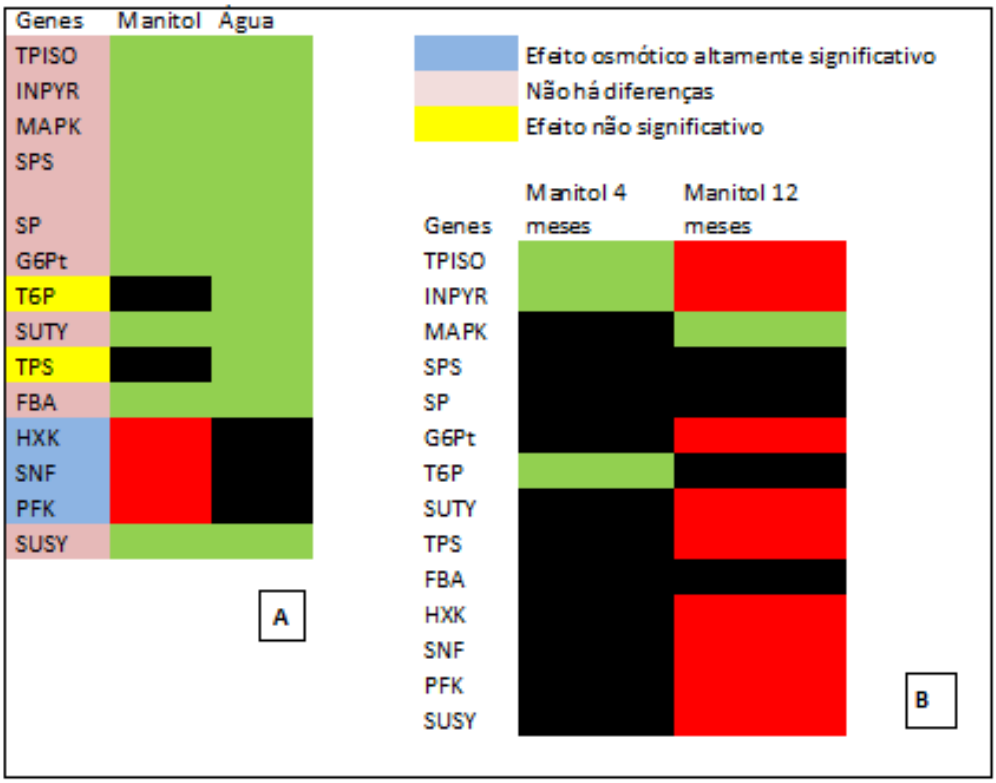


Figura 16 - Teste para controle de efeito osmótico no ensaio de sinalização de açúcares. Figura A: Relação de significância de expressão gênica entre os tratamentos expressão relativa entre 12 e 4 meses dentro dos tratamentos manitol e água. Figura B: Relação de significância de expressão gênica entre 4 e 12 meses, expressão relativa utilizando como controle o tratamento com água. Valores em verde aumento deexpressão estatisticamente significativa, valores em vermelho redução de expressão estatisticamente significativa, valores em preto sem alteraçõesde expressão significativas. REST.Teste de hipótese e intervalo de confiança à 95%

Em uma análise mais aprofundada desses efeitos Figuras (17 e 18), analisamos os efeitos na expressão gênica utilizando os controles água e manitol para confirmar se eram constantes dentre todos os tratamentos experimentais. Os genes que apresentavam expressões iguais dentre os possíveis controles estão destacados em amarelo. Aos 4 meses os únicos genes que apresentaram sua expressão inalterada em todos os tratamentos com os controles água e manitol foram: SPS e SP (em roxo). Já aos 12 meses os genes com expressão inalterada foram MAPK, FBA e SNF (em roxo). E o gene SUSY no tratamento 3-O-metilglicose, apresentou sua expressão oposta (destacado em azul) dentre os controles água e manitol, pois apresentou alta expressão para o tratamento com maintol e baixa expressão com água. Estando clara a presença de um efeito osmótico dos açúcares aplicados, por isso utilizamos o manitol como controle osmótico nas análises posteriores de expressão gênica relativa, de modo a se obter os reais resultados de expressão decorrentes da sinalização dos açúcares experimentais.

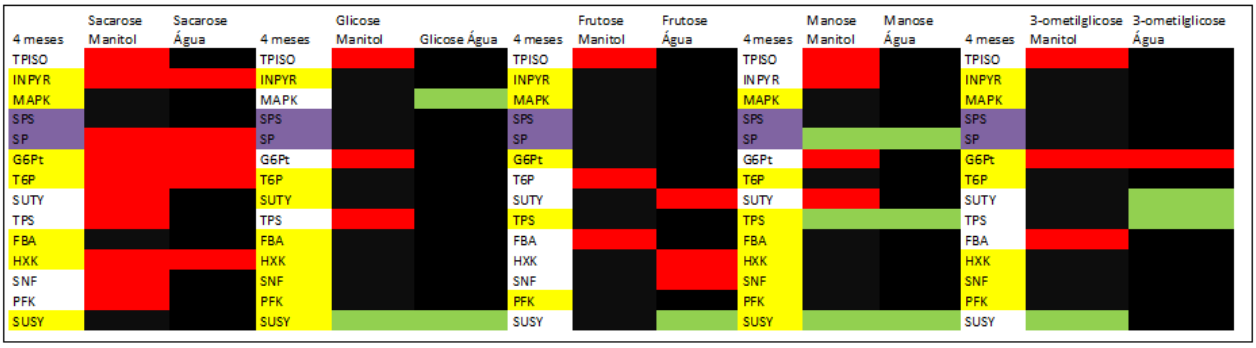


Figura 17 - Análise das expressões gênicas dentre todos os tratamentos experimentais utilizandoos controles manitol e água. Genes com o mesmo padrão de expressão dentre os controles são destacados em amarelo. Genes com o mesmo padrão de expressão em todos os tratamentos destacados e controles estão em roxo. Expressão oposta dentre os controles, destacado em azul. Idade da planta: 4 meses

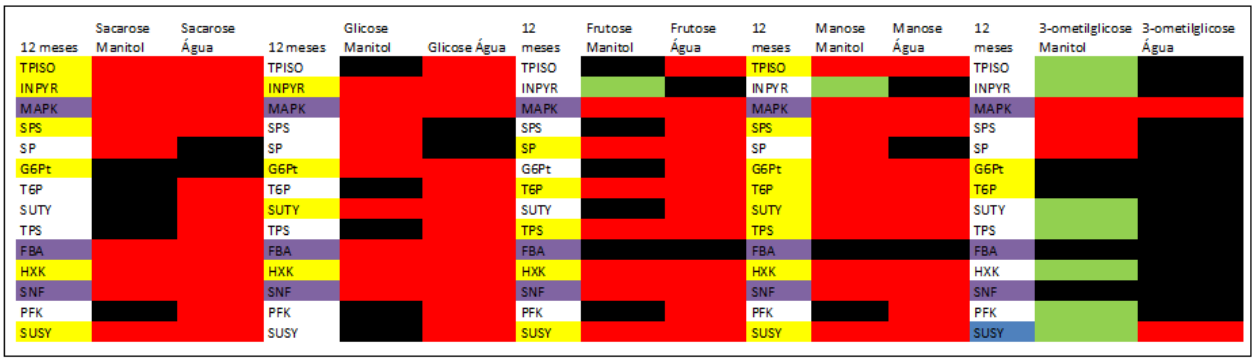


Figura 18 - Análise das expressões gênicas dentre todos os tratamentos experimentais utilizando os controles manitol e água. Genes com expressões inalteradas dentre os controles são destacados em amarelo. Genes com o mesmo padrão de expressão em todos os tratamentos destacados e controles estão em roxo. Expressão oposta dentre os controles, destacado em azul. Idade da planta:12 meses

Perfil de expressão gênica: sinalização de açúcares

Após as análises sobre o efeito osmótico para a determinação do melhor controle experimental para determinar a Expressão Gênica Relativa, foram obtidos os seguintes perfis de expressão gênica após os ensaios de sinalização de açúcares para 4 e 12 meses (Figuras 19 e 20). Para os gráficos dos perfis de expressão gênica por tratamento consultar ANEXO A.

Figura 19 - Expressão relativa do ensaio de sinalização de açúcares utilizando como controle o tratamento com manitol aos 4 meses. Valores em verde: alta expressão, valores em vermelho: baixa expressão, valores em preto sem mudanças significativas. Açúcares metabolizáveis: sacarose, glicose e frutose, Açúcares não metabolizáveis: manose e 3-o-metilglicose. REST:Teste de hipótese e intervalo de confiança à 95%

Observa-se que há mais genes diferencialmente expressos para 12 meses do que para 4 meses, e que a ação dos açúcares na maioria dos genes experimentais atua na repressão de sua expressão gênica o que será melhor detalhado na discussão (Figuras 19 e 20).

Figura 20 - Expressão relativa do ensaio de sinalização de açúcares utilizando como controle o tratamento com manitol aos 12 meses. Valores em verde: alta expressão, valores em vermelho: baixa expressão, valores em preto sem mudanças significativas. Açúcares metabolizáveis: sacarose, glicose e frutose, Açúcares não metabolizáveis: manose e 3-o-metilglicose REST:Teste de hipótese e intervalo de confiança à 95%

5.3 Metabolismo primário

Através do programa ChromaTOF, foram identificados 70 metabólitos em folhas não tratadas de cana-de-açúcar de 4 e 12 meses, com base nas bibliotecas disponíveis (*in house database)* (Tabela 3 e Figura 21). Para a identificação foi considerado o índice de retenção e cromatograma, de cada amostra.

Dentre os metabólitos identificados em folhas estão açúcares, ácidos orgânicos, ácidos graxos, fenóis e aminoácidos.

Tabela 3 - Metabólitos identificados nas folhas de cana-de-açúcar não tratadas, através do programa ChromaTOF (Continua)

Metabólito	RI	RT	m1	m2	m3	*Classe
1_Lactic acid	1060,1	345,85	117	148	191	OA
2_Glycolic acid	1075,6	356,35	177	205	161	OA
3_L-Alanine	1101,2	373,7	116	190		AA
4_OXALIC ACID	1128,2	391,05	103	190	219	OA
5_UN_1138.5	1138,5	397,65	220	160	190	UN
6_HEPTANOIC ACID	1171,4	418,8	144	188	202	OA
7_Valine	1210,5	443,4	144	218		AA
8_BENZOIC ACID	1248,4	466,05	105	135	179	PHE
9_Phosphoric acid	1264,4	475,55	299	133	211	Inorganic
10_SUCCINIC ACID	1304,5	499,3	132	176	151	OA
11_Glyceric acid	1320,3	508,1	189	292	205	Sugar-H
12_UN_1328.5	1328,5	512,65	134	184	285	UN
13_Itaconic acid	1335,2	516,35	148	215	259	OA
14_Maleic acid, 2-methyl-	1341,9	520,05	148	259	184	OA
15_Fumaric acid	1345,8	522,25	171	188	295	OA
16_Serine	1351	525,15	204	218	116	AA
17_Pipecolic acid	1361,9	531,2	156	157	230	OA
18_Threonic acid-1,4-lactone	1368,5	534,85	247	217	191	OA
19_ALLOTHREONINE	1376,1	539,1	218	291	203	AA
20_UN_1453.7	1453,7	580,3	154	172	243	UN
21_UN_1463.8	1463,8	585,55	234	205	261	UN
22_MALIC ACID	1477,3	592,6	101	233	335	OA
23_Aspartic acid	1509,7	609,15	232	218	188	AA
24_Methionine	1512,9	610,75	128	176		AA
25_Threonic acid	1546,1	627	292	205	220	OA
26_GLUTAMIC ACID	1609,6	657,9	246	128	369	AA
27_UN_1618.9	1618,9	662,25	333	259	186	UN
28_L-Phenylalanine	1622,6	663,95	218	192	268	AA
29_4-HYDROXYBENZOIC ACID	1624,2	664,7	267	282		PHE
30_Xylose_1	1640,9	672,45	103	217	307	Sugar
31_Xylose_2	1648,1	675,8	103	217	307	Sugar
32_Xylose_3	1662,9	682,7	103	217	307	Sugar

Tabela 3 - Metabólitos identificados nas folhas de cana-de-açúcar não tratadas, através do programa ChromaTOF (Conclusão)

33_Glucose, 1,6-anhydro	1693,4	696,9	204	217	189	Sugar
34_Ribitol	1711,2	704,9	217	205	189	Sugar
35_UN_1719.5	1719,5	708,55	163	302	392	UN
36_ACONITIC ACID	1737,8	716,6	229	211	285	OA
37_Ribonic acid	1749,8	721,9	292	205		Sugar-H
38_vanillic acid	1758,7	725,8	267	223	297	UN
39_Hexose	1763,6	727,95	205	319	163	Sugar
40_ISOCITRIC ACID	1806,1	746,55	273	319	375	UN
41_Dehydroascorbic acid dimer	1839,2	760,45	173	316	245	UN
42_Quinic acid	1846,4	763,45	345	255	191	OA
43_Fructose_1	1858,5	768,55	307	189	277	Sugar
44_Fructose_2	1867,3	772,25	307	189	277	Sugar
45_Mannose	1872,1	774,25	205	160	319	Sugar
46_GALACTOSE	1878,1	776,75	160	319	189	Sugar
47_UN_1896.7	1896,7	784,55	205	189	273	UN
48_MANNOSE	1904,7	787,85	205	160	319	Sugar
49_L-Lysine	1913,7	791,45	156	177	317	AA
50_COUMARIC ACID	1937,6	801	219	293	249	PHE
51_Glucopyranose	1958,7	809,45	204	191	206	Sugar
52_GLUCONIC ACID	2001,4	826,55	333	292	199	OA
53_UN_2010.1	2010,1	829,85	204	217	319	UN
54_myo-Inositol	2081,6	857,2	191	305	265	Sugar-OH
55_UN_2112.6	2112,6	868,85	205	157	319	UN
56_UN_2119.8	2119,8	871,5	205	157	319	UN
57_CAFFEIC ACID	2130,1	875,25	219	396	307	PHE
58_Phytol	2167,3	888,85	143	123		Alcohol
59_Phosphate-compound	2174,1	891,35	211	357	299	Inorganic
60_alpha-LINOLENIC ACID	2213,7	905,6	204	335		FA
61_Stearic acid	2238	914,15	132	341	201	FA
62_UN_2263.7	2263,7	923,15	290	217	319	UN
63_GLUCOSE-6-PHOSPHATE	2302,2	936,65	299	387	357	Sugar
64_UN_2352.5	2352,5	953,55	217	204	292	UN
65_Inositol-1-phosphate, myo-	2403,3	970,6	299	318	387	Sugar-OH
66_Trehalose	2731,6	1072,2	191	361	243	Sugar
67_D-Glucuronic acid	2910,2	1122,95	217	251	298	OA
68_Galactinol	2973,9	1141,05	204	305	243	Sugar
69_Quinic acid, 3-caffeoyl	3101,7	1179,95	255	345	307	PHE
70_Raffinose	3373,4	1285,8	271	437	319	Sugar

*AA (aminoacido), OA (ácido orgânico), FA (ácido graxo), PHE (fenóis), Sugar (carboidratos), UN (desconhecido).

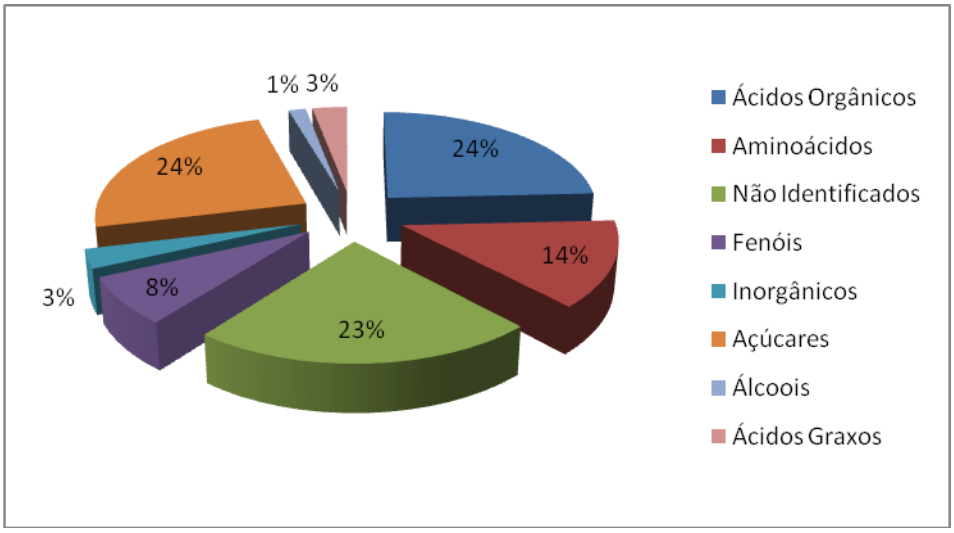


Figura 21- Classes de metabólitos identificados em folhas de cana-de-açúcar

Após a identificação dos metabólitos, estes foram analisados no software MatLab, para obtenção das respectivas áreas. Deste modo, cada metabólito foi alinhado utilizando-se as amostras provenientes de todos os tratamentos (Figura 22). O mesmo procedimento foi realizado para os 11 padrões internos.

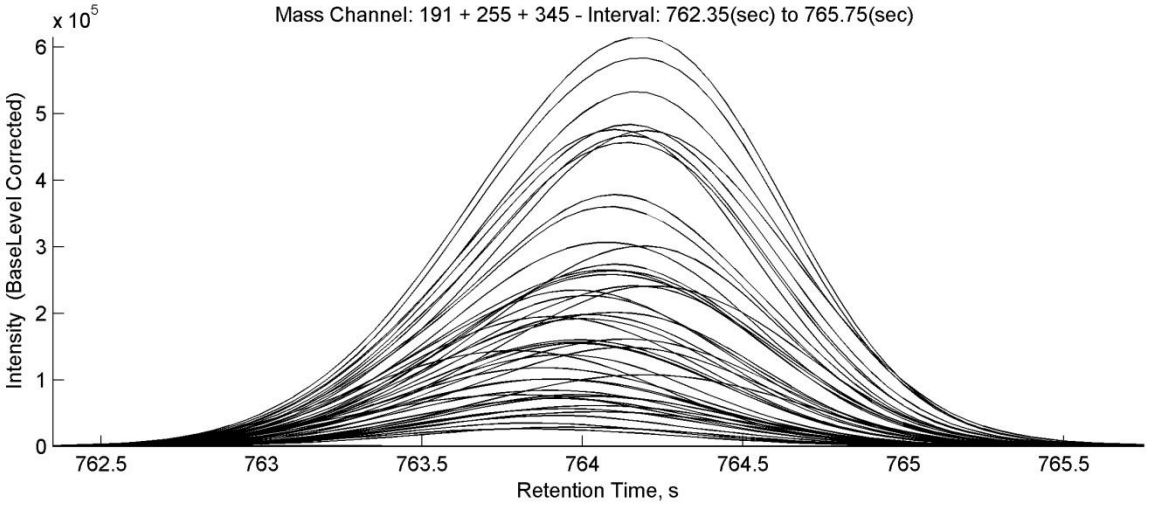


Figura 22 - Figura ilustrando o alinhamento do metabólito Ácido quiníco, com amostras provenientes de todos os tratamentos (total de 48) e, indicando a área considerada para análise

Com base nas áreas dos padrões internos, foi calculada a média das áreas, desvio padrão e desvio padrão relativo, para posterior normalização dos dados. Os dados normalizados foram utilizados para as análises multivariadas, utilizando-se Análise de Componentes Principais (PCA), através do software SIMCA. A partir da

observação da (Figura 23)**,** percebe-se que há uma tendência de separação entre os tratamentos 4 e 12 meses, explicadas pelos componentes 1 e 2 e, é possível verificar também que o tratamento Glicose 4 meses, apresenta um grande desvio, sendo então desconsiderado (Figura 24). No entanto, não foi possível encontrar um modelo que explicasse a diferença entre os componentes analisados, ou seja, por PCA não foi possível encontrar a formação de grupos distintos, considerando todos os tratamentos nas diferentes idades.

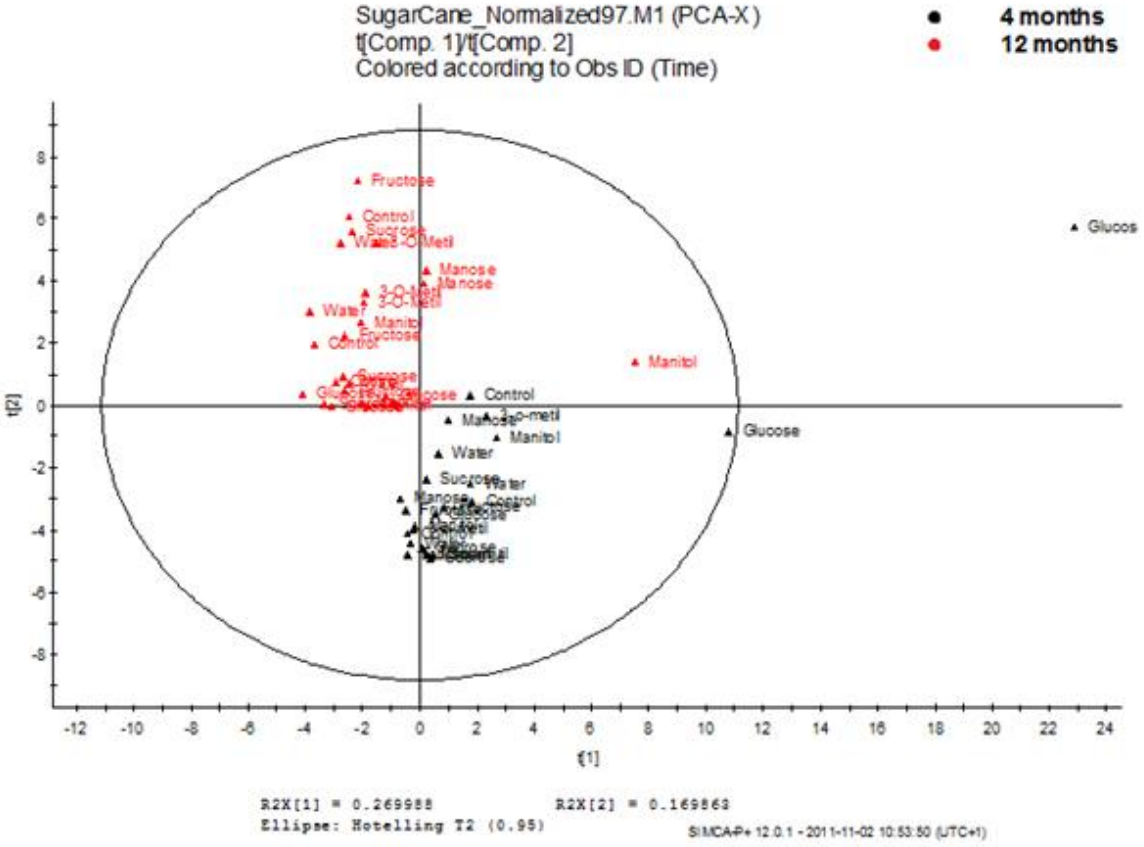


Figura 23 - PCAs entre idades das plantas e tratamentos aplicado (perspectiva vertical)

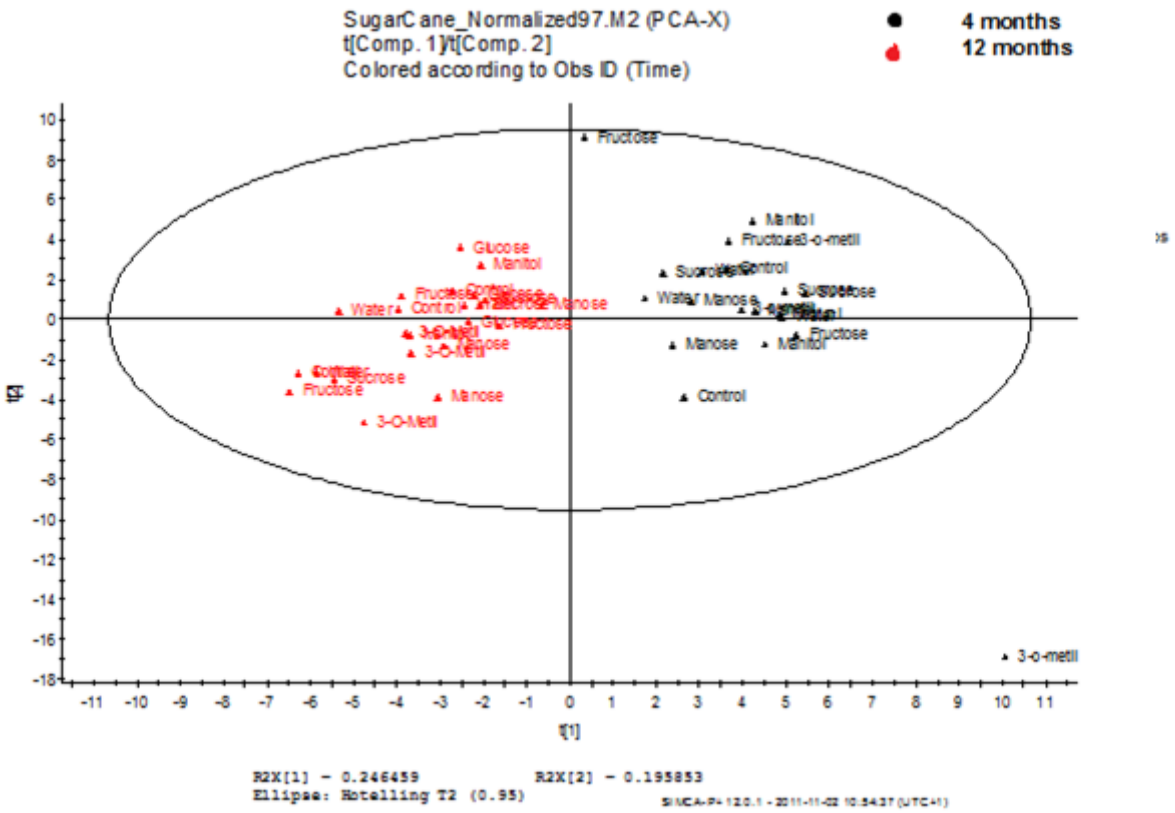


Figura 24 - PCAs entre idades das plantas e tratamentos aplicado (perspectiva horizontal)

E ainda, foi possível verificar diferenças no padrão de metabólitos entre o tratamento água e a planta sem tratamento (amostras coletadas e congeladas), sendo essa diferença explicada, inicialmente, por açúcares como mio-inositol, glucose-6-fosfato e fitol e, por aminoácidos como serina, acido glutâmico e ácido aspártico (Figura 25 e 26).

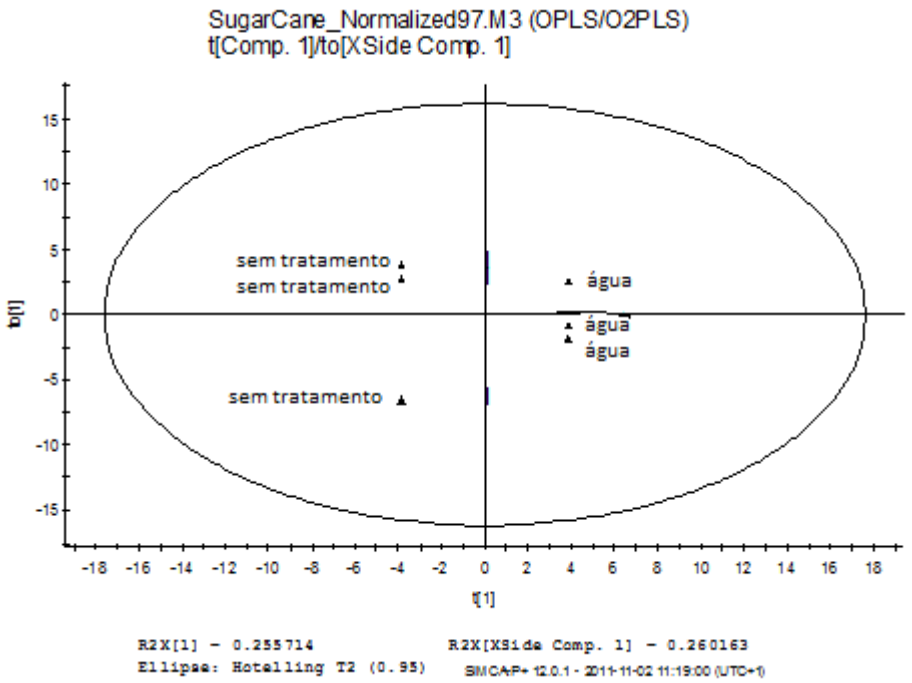


Figura 25 – OPLS (Optimized Potential for Liquid Simulations) demonstrando as diferenças nos padrões de metabólitos entre as amostras sem tratamento (coletadas e congeladas) e as amostras tratadas com água

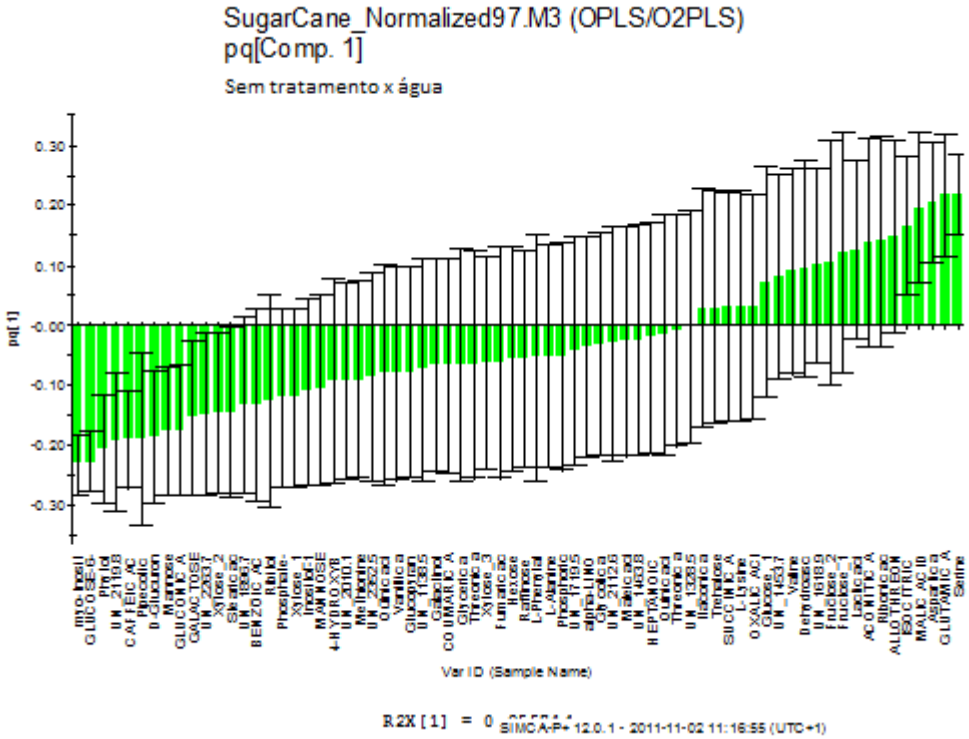


Figura 26 - Relações de diferenças entre os padrões de metabólitos entre as amostras sem tratamento (coletadas e congeladas) e as tratadas com água

A fim de verificar diferenças temporais entre os tratamentos, foram realizados PCAs, podendo ser observadas diferenças entre os tratamentos sacarose (Figura 27) e frutose (Figura 28).

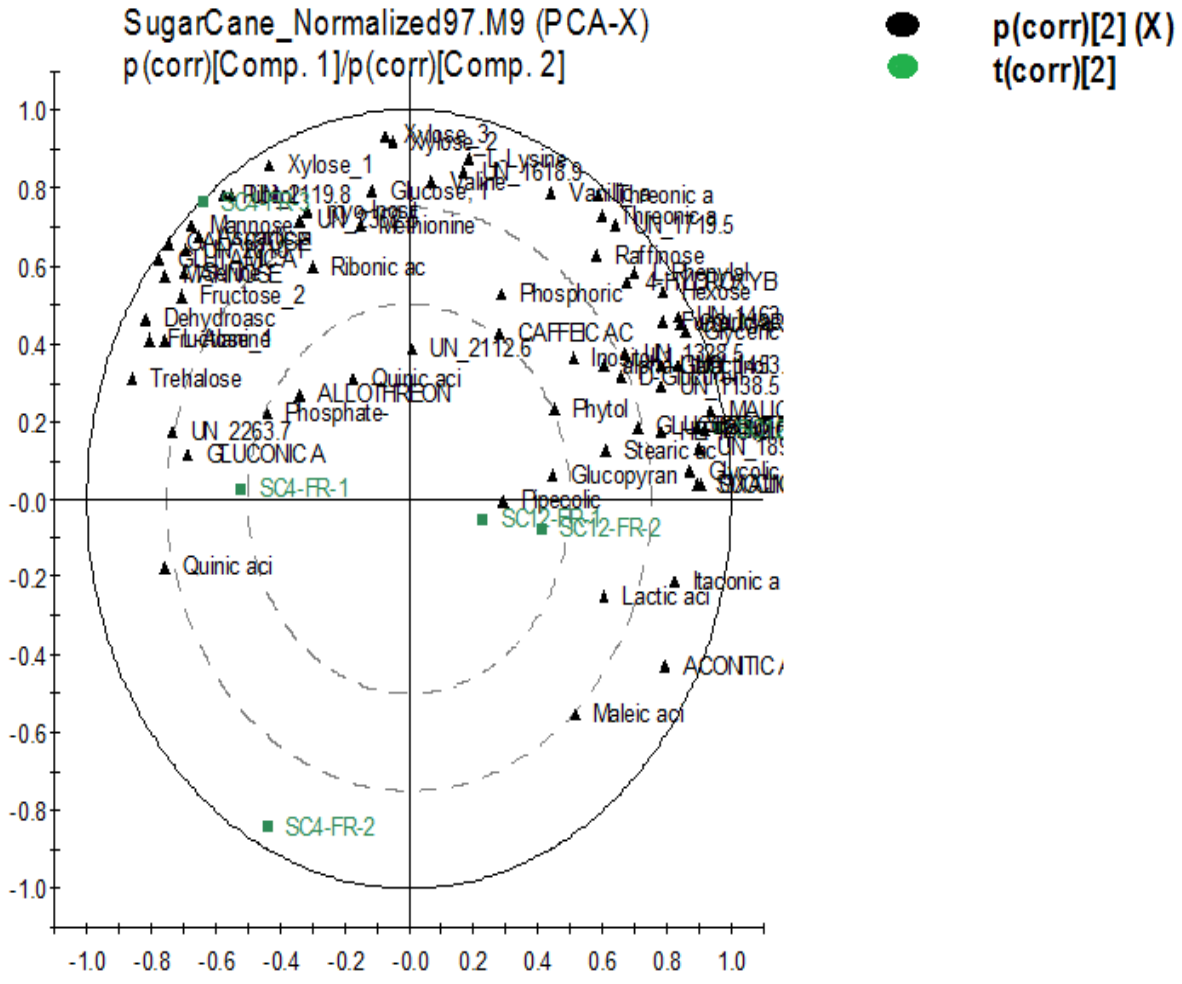


Figura 27- PCA Tratamentos diferenciais aos 4 meses SC4-FR e 12 meses SC12-FR (frutose), destacado em verde

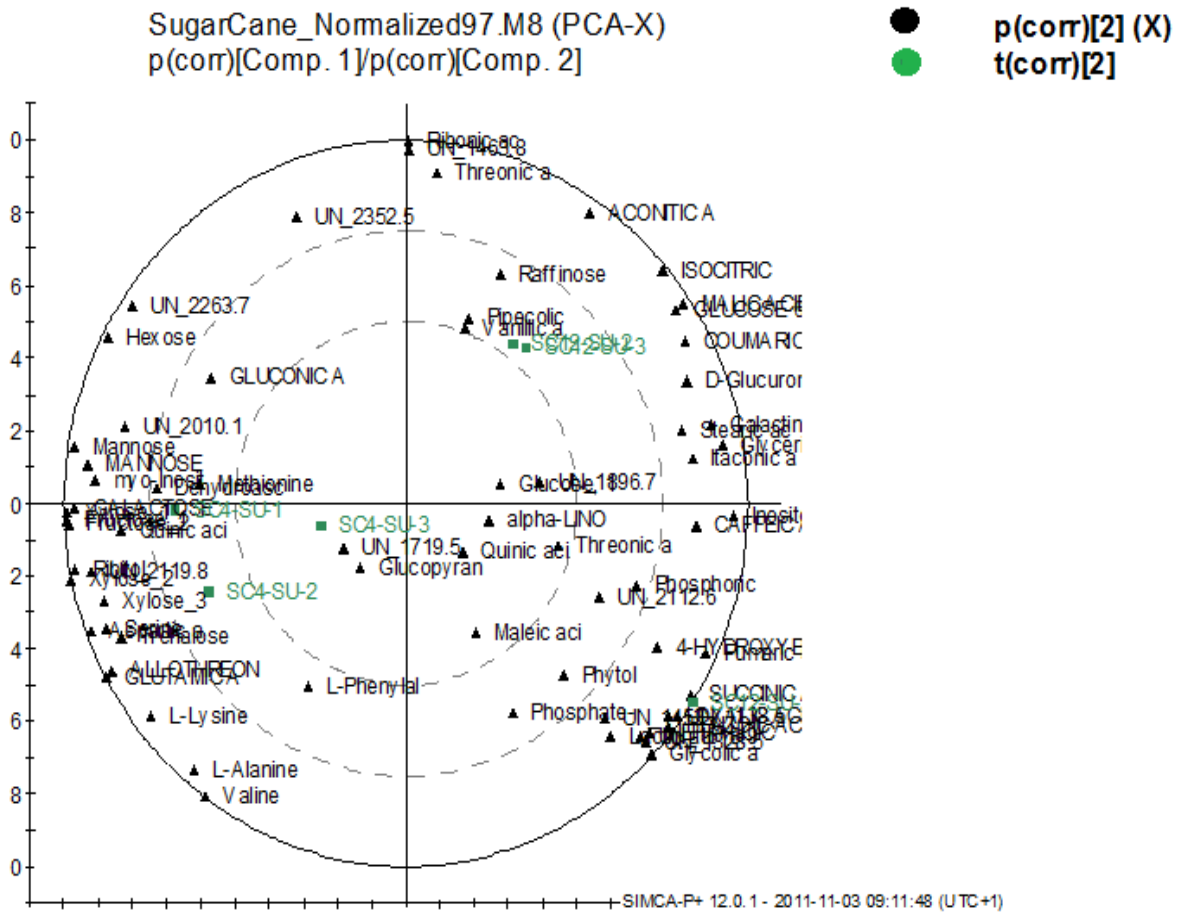


Figura 28 - PCA Tratamentos diferenciais aos 4 meses SC4-SU e 12 meses SC12-SU (sacarose) destacado em verde

No entanto, para o presente projeto tais análises PCA e OPLS não puderam separar os metabólitos por tratamento de maneira eficaz para as análises de metabólitos diferenciais, apenas em relação à idade das plantas, portanto, partiu-se para outros tipos de análise utilizando o software R.

Reconfiguração do perfil metabólico primário Identificado

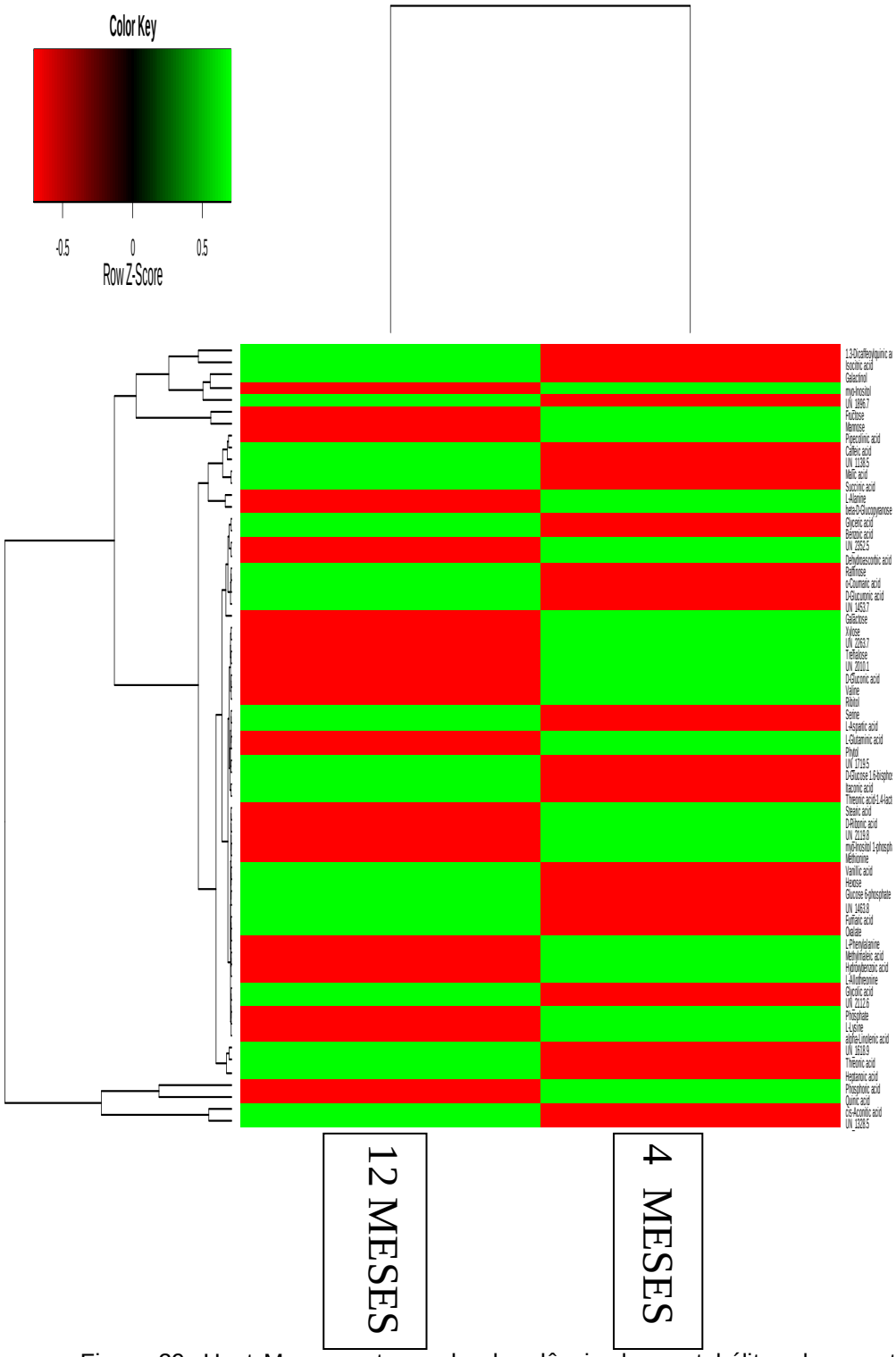


Figura 29- Heat Map com taxas de abundância dos metabólitos de amostras não tratadas entre 12 e 4 meses (Valores em vermelho: metabólitos pouco abundantes, Valores em verde: metabólitos abundantes)

Nas figuras 30 e 31, é possível verificar a variação de abundância dos metabólitos identificados, em relação aos diferentes tratamentos, que foram detectados por GC/MS em folhas de cana-de-açúcar aos 12 meses e aos 4 meses, respectivamente.

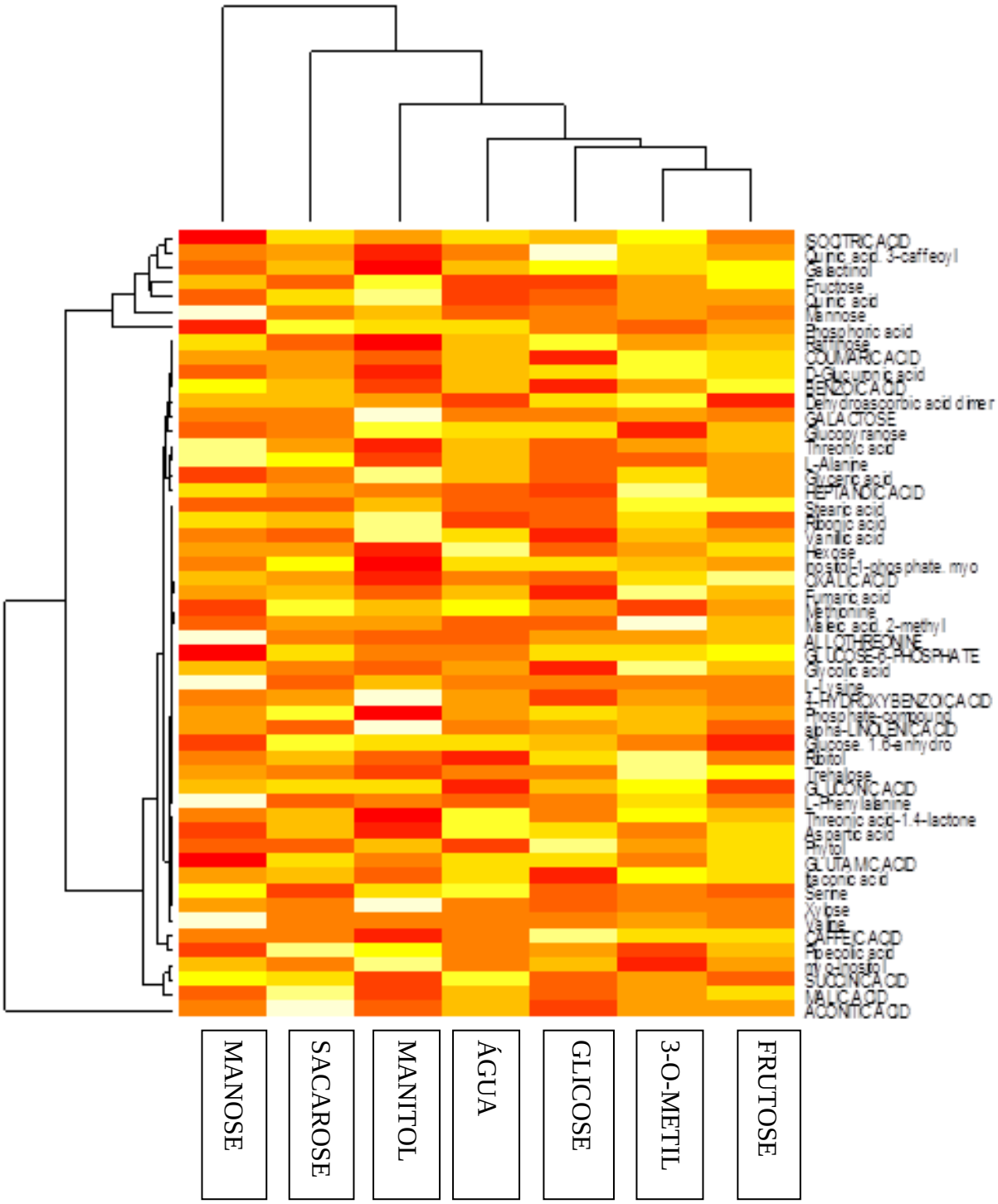


Figura 30 - *Heat map* amostras com 12 meses, a intensidade da cor (laranja) demonstra a maior abundância de metabólitos

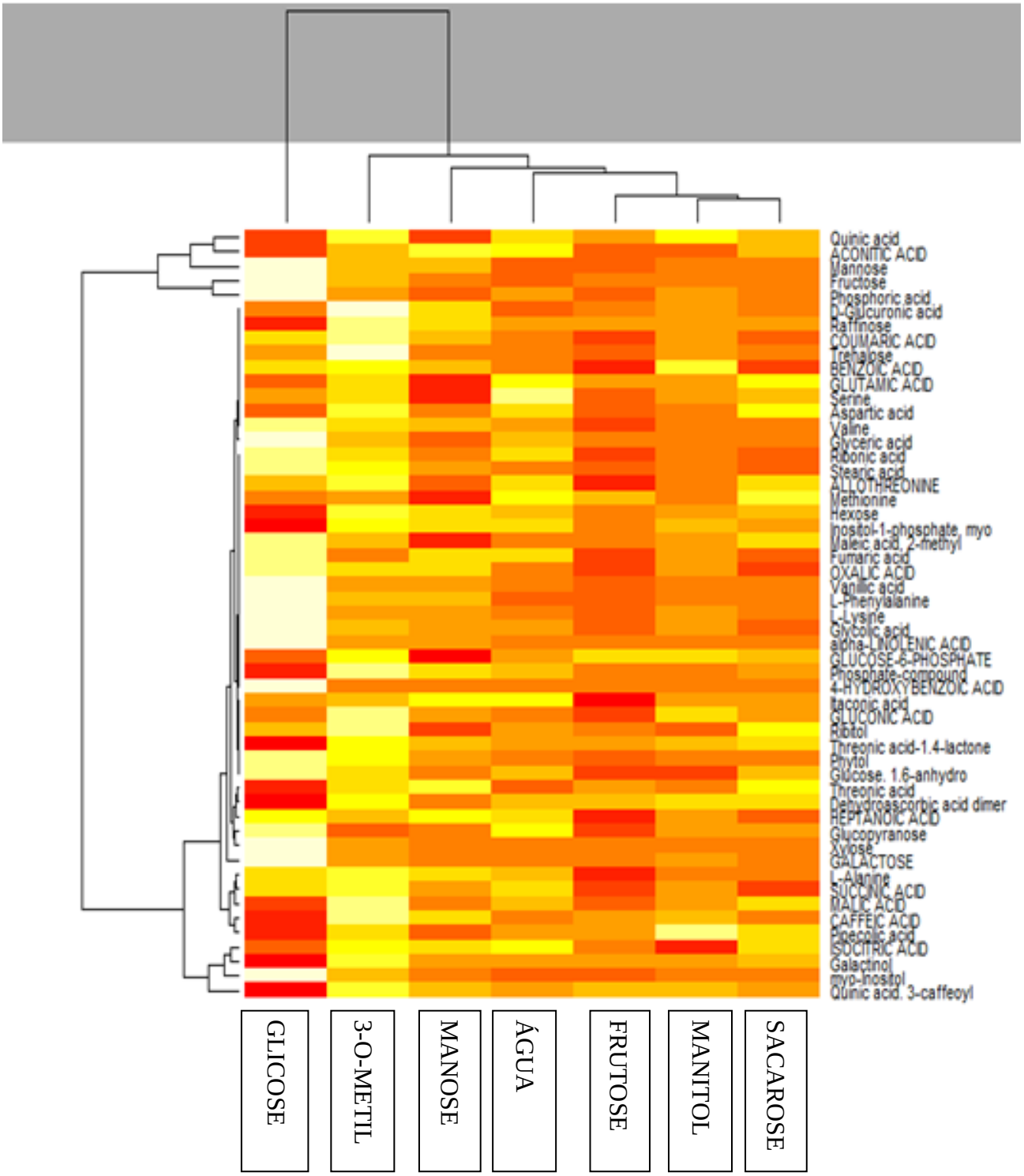
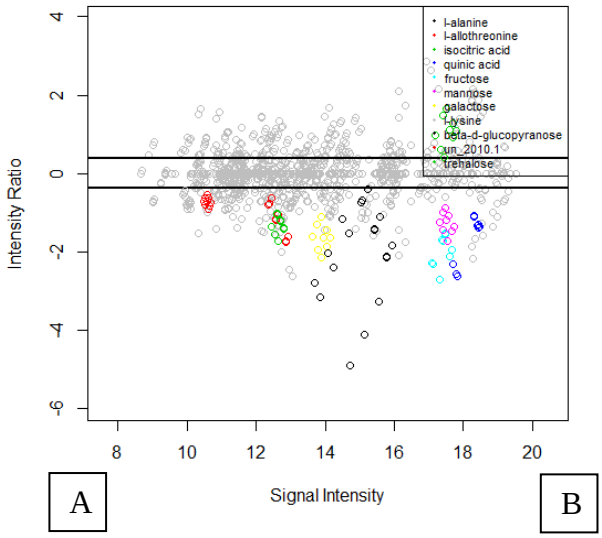


Figura 31 - *Heat map* amostras com 4 meses, a intensidade da cor (laranja) demonstra a maior abundância de metabólitos

Metabólitos diferenciais ao longo do desenvolvimento

Para identificar os metabólitos cujas concentrações são diferenciais em relação a um determinado controle, foi utilizando o algorítimo HT-Self, no qual se determina um limiar para distinguir os metabólitos diferenciais. Assim como nas análises de expressão gênica, primeiro foram analisadas as tendências de mudanças dos metabólitos ao longo do desenvolvimento. Para tal, realizaram-se as análises utilizando as amostras, sem tratamento (amostras coletadas e congeladas) de modo a se observar preliminarmente os efeitos biológicos, aos 12 meses em relação a 4 meses (Figura 32).

Relação metabólitos diferenciais entre 4 e 12 meses: sem tratamento



Metabólito	% Aumento ou Redução de concentração dos metabólitos.
Trealose	100%
L-Alanine	30%
L-Allothreonine	40%
Isocitric acid	30%
Quinic acid	100%
Fructose	100%
Mannose	50%
Galactose	100%
L-Lysine	30%
beta-D-Glucopyranose	100%
UN_2010.1	50%

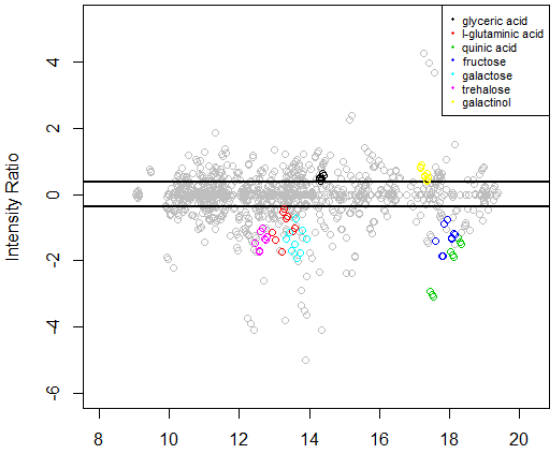
B

Figura 32- A: Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R. Metabólitos diferenciais entre 4 e 12 meses amostras sem tratamento utilizando 4 meses como controle. Os metabolitos diferenciais acima ou abaixo de 30% a partir do limiar são considerados significativos. B: Listagem de todos os metabólitos diferenciais acima (em verde) ou abaixo (em vermelho) de 30% considerados significativos

Análise dos controles experimentais ao longo do desenvolvimento da planta

Posteriormente, foram observados os efeitos osmóticos dos tratamentos ao se observar as alterações dos metabólitos significativos das amostras folhas em solução água (controle experimental) Figura 33 e sobre efeito de um soluto compatível (controle osmótico manitol) Figura 34. Assim como foi realizado para os experimentos de transcriptômica.

Relação metabólitos diferenciais entre 4 e 12 meses: água



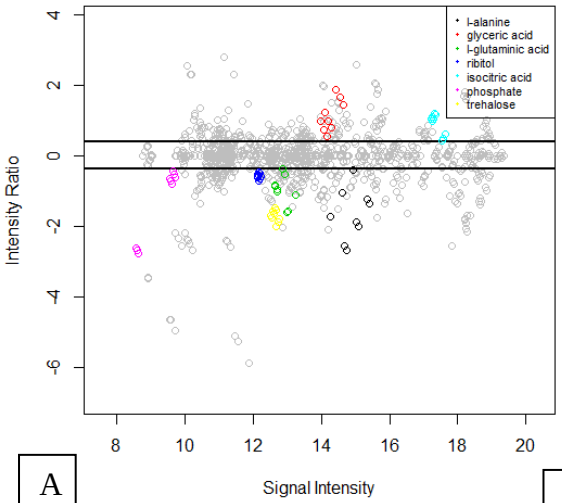
A

B

Metabólito	% Aumento ou Redução de concentração dos metabólitos.
Glyceric acid	30%
L-Glutaminic acid	30%
Quinic acid	100%
Fructose	50%
Galactose	50%
Trealose	100%
Galactinol	30%

Figura 33 - A: Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R. Metabólitos diferenciais entre 4 e 12 meses amostras tratadas com água utilizando 4 meses como controle. Os metabolitos diferenciais acima ou abaixo de 30% a partir do limiar são considerados significativos. B: Listagem de todos os metabólitos diferenciais acima (em verde) ou abaixo (em vermelho) de 30% considerados significativos

Relação metabólitos diferenciais entre 4 e 12 meses: manitol



A

B

Metabólito	% Aumento ou Redução de concentração dos metabólitos.
L-alanina	30%
Acido glicerico	40%
Acido Glutamico	30%
Ribitol	30%
Acido Isocítrico	30%
Fosfato	30%
Trealose	100%

Figura 34 - A: Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R. Metabólitos diferenciais entre 4 e 12 meses amostras tratadas com manitol utilizando 4 meses como controle. Os metabolitos diferenciais acima ou abaixo de 30% a partir do limiar são considerados significativos. B: Listagem de todos os metabólitos diferenciais acima (em verde) ou abaixo (em vermelho) de 30% considerados significativos

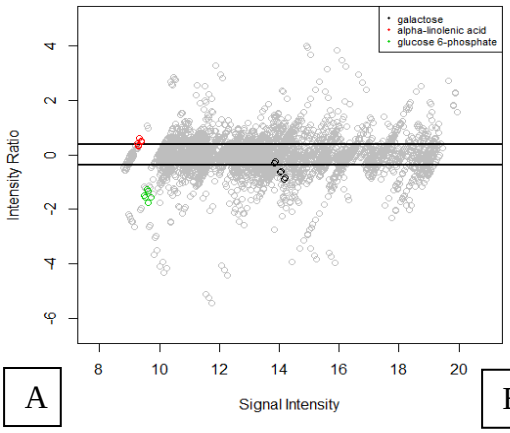
Metabólitos diferenciais e sinalização de açúcares

A princípio o controle experimental seria o tratamento com água, Figuras 36 e 38, no entanto devido à ação do efeito osmótico identificado nos ensaios de expressão gênica optou-se por utilizar também a solução com o açúcar manitol como controle osmótico, Figuras 35 e 37 a fim de se identificar possíveis efeitos osmóticos.

Para tal determinou-se um perfil de alteração do metabolismo por idade, 4 e 12 meses.

4 meses

Controle: manitol

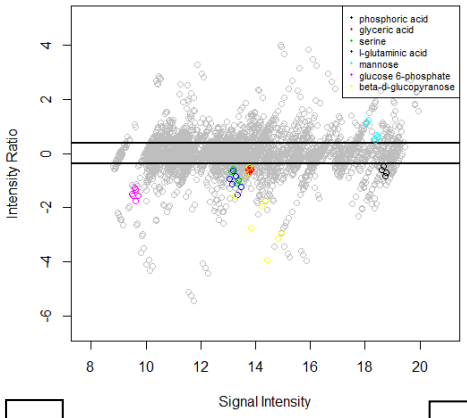


B

Metabólito	Tratamento	% Aumento ou Redução de concentração dos metabólitos.
Galactose	Manose	50%
alpha-Linolenic acid	Manose	30%
Glucose 6-phosphate	Manose	100%

Figura 35 - A: Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 4 meses controle manitol. Os metabolitos diferenciais acima ou abaixo de 30% a partir do limiar são considerados significativos. B: Listagem de todos os metabólitos diferenciais acima (em verde) ou abaixo (em vermelho) de 30% considerados significativos

Controle: água



A

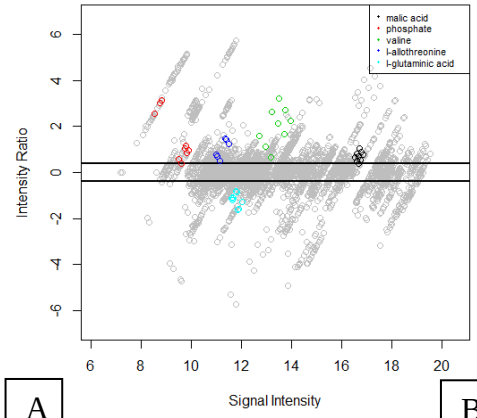
B

Metabólito	Tratamento	% Aumento ou Redução de concentração dos metabólitos.
Phosphoric acid	Manose	30%
Glyceric acid	Manose	40%
Serine	Manose	40%
L-Glutaminic acid	Manose	50%
Mannose	Manose	30%
Glucose 6-phosphate	Manose	50%
beta-D-Glucopyranose	Frutose	40%

Figura 36 - A: Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 4 meses controle água. Os metabolitos diferenciais acima ou abaixo de 30% a partir do limiar são considerados significativos. B: Listagem de todos os metabólitos diferenciais acima (em verde) ou abaixo (em vermelho) de 30% considerados significativos

12 meses:

Controle: manitol



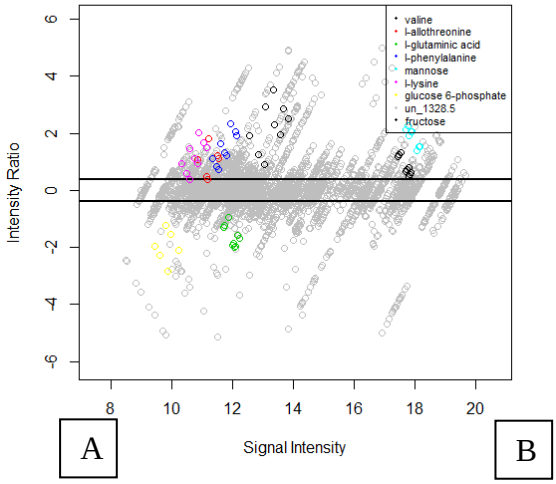
A

B

Metabólito	Tratamento	% Aumento ou Redução de concentração dos metabólitos.
Malic acid	Sacarose	30%
Phosphate	Sacarose	30%
Valine	Manose	100%
L-Allothreonine	Manose	40%
L-Glutaminic acid	Manose	50%

Figura 37 - A: Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 12 meses controle manitol. Os metabolitos diferenciais acima ou abaixo de 30% a partir do limiar são considerados significativos. B: Listagem de todos os metabólitos diferenciais acima (em verde) ou abaixo (em vermelho) de 30% considerados significativos

Controle: água



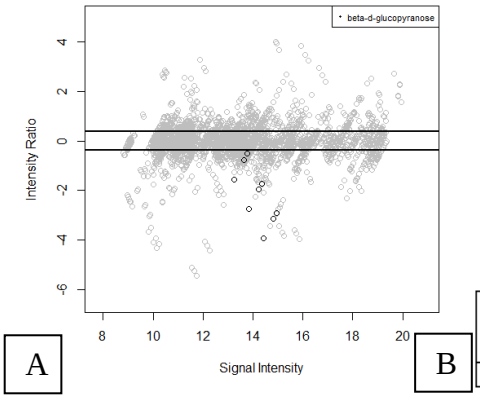
Metabólito	Tratamento	% Aumento ou Redução de concentração dos metabólitos.
Valine	Manose	50%
L-Allothreonine	Manose	30%
L-Glutaminic acid	Manose	100%
L-Phenylalanine	Manose	50%
Mannose	Manose	50%
L-Lysine	Manose	30%
Glucose 6-phosphate	Manose	100%
Fructose	Frutose	40%
UN_1328.5	3-ometilglicose	30%

Figura 38 - A: Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 12 meses controle água. Os metabolitos diferenciais acima ou abaixo de 30% a partir do limiar são considerados significativos. B: Listagem de todos os metabólitos diferenciais acima (em verde) ou abaixo (em vermelho) de 30% considerados significativos

Metabólitos diferenciais entre sacarose, glicose, frutose e 3-o-metilglicose

A manose foi o tratamento mais diferencial dentre todas as análises até então, mascarando os efeitos dos outros açúcares nas análises. As análises posteriores não consideram a manose como açúcar experimental, Figuras 39, 40 e 41.

4 meses: controle água



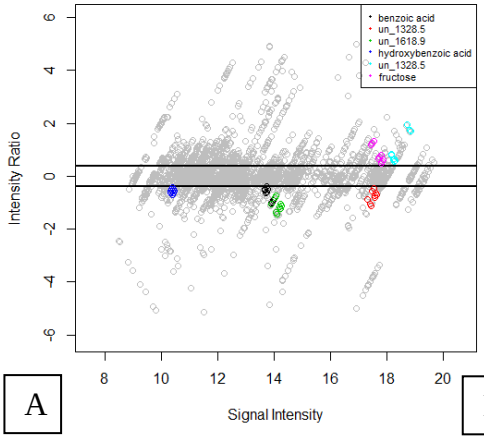
Metabólito	Tratamento	% Aumento ou Redução de concentração dos metabólitos.
Beta-d-Glucopiranose	Frutose	30%

Figura 39 - A: Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 12 meses controle água. Os metabolitos diferenciais acima ou abaixo de 30% a partir do limiar são considerados significativos. B: Listagem de todos os metabólitos diferenciais acima (em verde) ou abaixo (em vermelho) de 30% considerados significativos

4 meses: controle manitol

Não houve metabólitos significativos.

12 meses: controle água

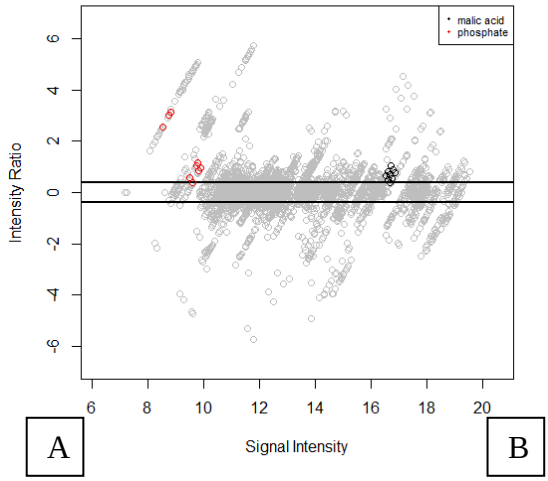


B

Metabólito	Tratamento	% Aumento ou Redução de concentração dos metabólitos.
UN_1328.5	Glicose	40%
UN_1618.9	Glicose	50%
Hydroxybenzoic acid	Glicose	30%
UN_1328.5	3-o-metilglicose	30%
Fructose	Frutose	40%

Figura 40 - A: Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 12 meses controle água. Os metabolitos diferenciais acima ou abaixo de 30% a partir do limiar são considerados significativos. B: Listagem de todos os metabólitos diferenciais acima (em verde) ou abaixo (em vermelho) de 30% considerados significativos

12 meses: controle manitol



B

Metabólito	Tratamento	% Aumento ou Redução de concentração dos metabólitos.
Malic Acid	Sacarose	30%
Fosfate	Sacarose	30%

Figura 41 - A: Resultado do teste HT-Self 1.3 no software R 12 meses controle água. Os metabolitos diferenciais acima ou abaixo de 30% a partir do limiar são considerados significativos. B: Listagem de todos os metabólitos diferenciais acima (em verde) ou abaixo (em vermelho) de 30% considerados significativos

6 DISCUSSÃO

6.1 Expressão gênica

Perfil de expressão geral durante o desenvolvimento da planta

Nas amostras tratadas com água, as quais representam a planta sem efeitos de tratamentos exógenos, é possível observar que entre 4 e 12 meses a expressão dos genes analisados tende a aumentar conforme o desenvolvimento da planta, exceto para a HXK, a SNF e PFK que não apresentaram mudanças significativas entre as idades (Figura 15).

Esse aumento de expressão diferencial aos 12 meses implica no fato de que a planta está alterando seu metabolismo durante estas etapas do desenvolvimento, sendo que aos 4 meses está em pleno desenvolvimento vegetativo e crescimento, e aos 12 meses, a folha passa a assumir seu papel de fonte, na produção de açúcares. Isso também é explicado pelo fato de que as proteínas quinases HXK, SNF e PFK não apresentam alterações significativas entre as idades, pois seu papel é de sinalização e não de metabolismo de síntese de açúcares.

Ensaios de sinalização de açúcares: efeito osmótico em cana-de-açúcar

Para os resultados de expressão gênica após os ensaios de sinalização de açúcares é possível observar também que a planta está mais susceptível ao efeito osmótico aos 12 meses (Figura 16), fazendo-se necessário eliminar esse efeito da análise a fim de se analisar o efeito do açúcar na expressão dos genes estudados, para tal, optou-se em utilizar a solução com manitol como controle experimental para as posteriores análises de sinalização de açúcares. Pois é preciso averiguar se as mudanças de expressão gênica são decorrentes da sinalização dos açúcares em si ou se possuem efeitos osmóticos que influenciam essa expressão.

Com os resultados obtidos, é possível inferir o que já foi afirmado pela literatura, que o manitol, possui potencial osmótico similar ao da sacarose e demais hexoses (STOOP et al., 1996), e esse potencial osmótico altera-se de acordo com os tratamentos e a idade da planta (Figuras 17 e 18). Por isso não é possível determinar um padrão de exclusão dos genes pelo fato de haverem apresentado efeito osmótico, pois o manitol atua como soluto compatível aos demais açúcares (STOOP et al.,1996). Assim, de modo a se determinar se as alterações de expressão gênica são decorrentes da sinalização do açúcar em questão ou se são produto do efeito osmótico deste, o controle água não serviu, como controle

experimental para o ensaio de sinalização de açúcares, devido ao efeito osmótico aparente nos resultados, apenas sendo utilizado como tratamento para as análises de perfis de expressão durante o desenvolvimento da planta.

Essa sensibilidade osmótica pode ser explicada pelo fato de que a planta deve passar por um estresse hídrico de modo que alcance a capacidade máxima de acúmulo de sacarose no campo e evitando o florescimento para antes da colheita (RODRIGUES, 1995).

Elucidar tais vias desse fenômeno tem sido um desafio amplamente investigado por diversos grupos de pesquisa no Brasil, Austrália e África do Sul, e está diretamente relacionado com a questão de melhoramento da capacidade de acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar. Fazendo-se necessário correlacionar a resistência ao estresse hídrico e a capacidade final de acúmulo de sacarose (SILVA et al., 2011)

Expressão gênica: sinalização de açúcares

Enzimas componentes do metabolismo de carboidratos

Frutose-1,6- bisfosfato aldolase (FBA)

A frutose bisfosfato aldolase quebra a frutose 1-6 bisfosfato em gliceraldeído 3-fosfato e diidroxiacetona fosfato na glicólise. Ela está relacionada também com a regeneração da Rubisco, durante o ciclo de Calvin na fotossíntese, para a posterior fixação de carbono (NELSON E COX 2005). Durante o período fotossintético ativo a triose-P diidroxiacetona P (DHAP) é convertida a frutose-1,6- bisfosfato (F1,6P) por uma aldolase (FBA) e subsequentemente hidrolisado para formar a frutose-6-fosfato (F6P), pela isoenzima citosólica FBPase ou pela fosfofrutoquinase dependente de pirofosfato (PFK).

Nas figuras 19 e 20 é possível observar que os tratamentos frutose e 3-o-metilglicose aos 4 meses e sacarose e glicose aos 12 meses reprimem a FBA entre as idades, o que pode demonstrar uma resposta de sinalização dependente do metabolismo fotossintético ao longo do desenvolvimento da planta, devido à essa ação sinalizadora negativa da sacarose apenas aos 12 meses o que pode ser relacionado com o que se determinou recentemente a respeito do aumento de FBA

em plastídeos, ser diretamente proporcional às taxas de crescimento e atividade fotossintética em tabaco, (UEMATSU et al., 2012).

6- Fosfofruto-1-quinase dependente de pirofosfato (PFK)

A fosfofrutoquinase PFK1 é a mais importante enzima reguladora da glicólise. Fosforila a Frutose 6-Fosfato em Frutose 1-6 fosfato, que corresponde a uma reação irreversível e de controle da via metabólica. Essa etapa metabólica ocorre para deixar a molécula simétrica para a etapa seguinte (NELSON E COX 2005).

Em cana-de-açúcar, sugeriu-se que a PFK possui um papel mais importante no metabolismo de carboidratos em plantas (HELDT, 1997; SUZUKI et al., 2003) e por conseguinte obter um papel chave no processo enquanto a cana-de-açúcar ajusta seu crescimento em função da síntese de sacarose, exportação, importação e utilização (GROENEWALD e BOTHA, 2001; SUZUKI et al., 2003). Plantas transgênicas de cana-de-açúcar com PFK reduzida demonstraram possuir um aumento na sacarose do colmo (GROENEWALD e BOTHA, 2007), talvez, sugerindo uma preferência sob a síntese de sacarose ao invés de glicose nestas plantas. Até mesmo um pequeno ajuste ao aumento do fluxo de sacarose seria favorável no colmo de cana-de-açúcar e pequenas mudanças similares foram detectadas em tabaco e batata (NIELSEN e STITT, 2001; HAJIREZAEI et al., 1994).

No entanto, nas figuras 19 e 20, é possível observar uma repressão do gene em resposta a sacarose aos 4 meses, e aumento de expressão apenas por 3-o-metilglicose aos 12 meses, o que demonstrou que este gene não apresentou alta resposta de sinalização aos tratamentos aplicados, sendo talvez sua regulação não dependente de respostas de sinalização de açúcares.

Hexoquinase (HXK)

A hexoquinase é a enzima glicolítica que canaliza a glicose na glicólise (Glc+ ATP – Glc6P + ADP) (LORETI et al., 2001). E está envolvida com a sensibilidade à glicose. Pois a glicose pode ser reconhecida por si só ou ser quebrada por uma hexokinase.

Esta enzima apresenta um papel regulatório principal no status de sensibilidade aos açúcares e iniciando cascatas de sinalização que influenciam o metabolismo geral da planta. Apesar de inicialmente questionado (HALFORD et al., 1999), o envolvimento da HXK na sensibilidade dos açúcares é amplamente

explorado (MOORE e SHEEN, 1990, LORETI et al., 2001; ROLLAND et al., 2002; HARRINGTON e BUSH, 2003).

O tratamento sacarose reprime a ação da hexoquinase nas 2 idades, ela é reprimida também pela glicose, frutose e manose aos 12 meses, (Figuras 19 e 20), e é superexpressa para 3-o-metilglicose aos 12 meses. O que pode indicar o papel regulatório da hexoquinase no status de sensibilidade dos açúcares, no entanto com maior intensidade aos 12 meses.

Triosefosfato isomerase (TPiso)

Enzima que atua na glicólise interconvertendo o gliceraldeído-3-fosfato e a dihidroxiacetona, que são isômeros. Ocorre então a conversão da dihidroxicetona-P em gliceraldeído 3P, a única triose que pode continuar sendo oxidada para produção de ATP (NELSON E COX 2005). A triose fosfato isomerase plastidial está relacionada com a mobilização de reservas da semente e estabelecimento das mudas (CHEN e THELEN, 2010).

Sua sinalização foi negativa para todos os tratamentos, aos 4 meses e sacarose e manose nas duas idades e no tratamento com 3-o-metilglicose, aos 12 meses, apresentou uma alta expressão (Figuras 19 e 20).

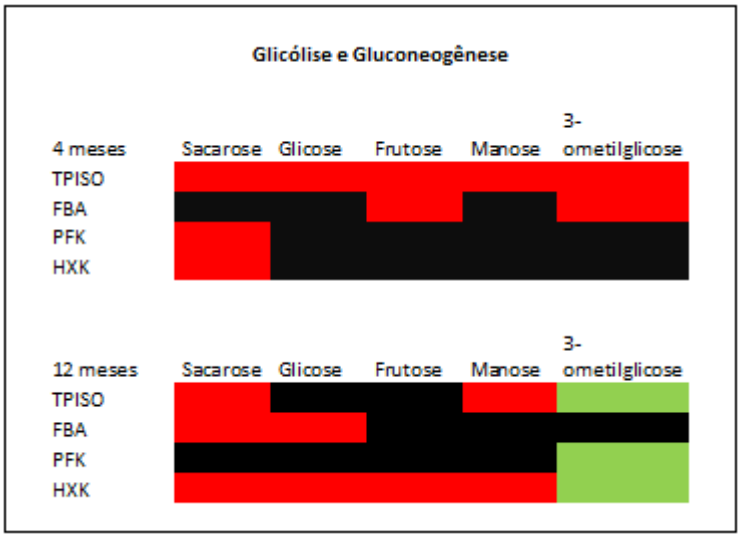


Figura 42 - Perfi de expressão gênica dos genes envolvidos na glicólise, aos 4 e aos 12 meses

No que se refere às enzimas relacionadas à glicólise e Gluconeogênese, aos 4 meses as enzimas TPISO e FBA são reprimidas por frutose, e PFK e HXK por

sacarose, aos 12 meses TPISO e FBA são reprimidos por sacarose, e a HXK é reprimida por todos os açúcares experimentais Figura 42.

Sinalização, transporte e metabolismo de fosfato Inorgânico

Pirofosfatase Inorgânica (InPyR)

Recentemente foi evidenciado que as pirofosfatases inorgânicas das plantas complementam funcionalmente a atividade vacuolar de transporte da ATPase (PEREZ-CASTIÑEIRA et al., 2011). O que é interessante considerando uma atividade sinalizadora desta proteína em resposta a açúcares.

Arabidopsis transgênicas superexpressando pirofosfatase inorgânica (InPYR; EC: 3.6.1.1) exibiram aumentos significativos nas concentrações de açúcares e Pi e um decréssimo associado nas taxas fotossintéticas, sugerindo um importante papel regulatório para a InPYR na manutenção da taxa ótima de PPi (LEE et al., 2005). No entanto, a sensibilidade de diferentes espécies ao *feedback* fotossintético negativo baseado nas mudanças dos status da concentração dos açúcares das folhas e as demais interações com Pi, podem variar considerávelmente (KRAPP e STITT, 1995).

Nas Figuras 19 e 20 é possível observar que aos 4 meses há uma repressão na expressão pelos tratamentos sacarose e manose, aos 12 meses o gene é ativado por frutose, manose e 3-ometilglicose.

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

As proteínas quinases ativadoras de mitose são vastas nas plantas, somente no genoma de *Arabidopsis* existem 20, e a maioria delas possui função indefinida ainda. No entanto, algumas MAPKs como a MAPK3 de *Arabidopsis* foram caracterizadas por estarem relacionadas com sinalização e resposta das plantas à sinais de defesa (DÓCZI et al., 2007). Entre outras funções em sinalização (JONAK *et al*., 1996; LEE *et al*., 2001; ZHANG e KLESSIG, 2002)

No caso da MAPK de cana-de-açúcar, não houve diferenças significativas dentre os tratamentos aplicados aos 4 meses (Figuras 19 e 20), somente aos 12 meses, havendo uma repressão significativa em sua expressão diante de todos os tratamentos assim como, no experimento de MCCORMICK, 2007 e 2008b. É difícil encontrar um papel específico para esta enzima e a relação fonte e dreno, no

entanto pelo fato de que sua expressão só foi significativa aos 12 meses, este pode ser um grande indício.

Foi sugerido que na regulação da fotossíntese em folhas de plantas C4, envolve a fosforilação da enzima PEPC e uma possível co-mediação por MAPKs e hexoses (JEANNEAU *et al.*,2002; MCCORMICK, 2007).

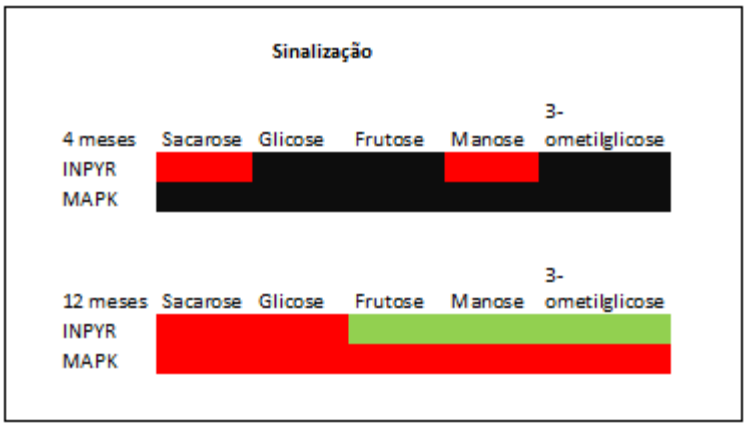


Figura 43 - Genes relacionados com sinalização celular, aos 4 e aos 12 meses

Nos genes relacionados à Sinalização Celular, aos 4 meses apenas INPYR respondeu negativamente à Sacarose e Manose, e aos 12 meses a INPYR e MAPK foi reprimida por sacarose e glicose e apresentaram sinalização oposta em resposta à frutose e manose Figura 43.

Transportadores de açúcares

***Sugar transporter type 2a. (putative)* (SUTY)**

Utilizou-se aqui uma das proteínas transportadoras de açúcar que foi possível identificar no banco do SUCEST.

Aos 4 meses sua expressão foi reprimida nos tratamentos sacarose e manose, aos 12 meses a sua expressão foi reprimida por glicose, manose e estimulada por 3-ometilglicose, Figuras 19 e 20. Não se pode afirmar que este transportador é exclusivo de dissacarídeos ou monossacarídeos, pois apresenta expressão diferencial para todos os açúcares exceto frutose Figura 44.

Glicose -6- Fosfato/ transportador de fosfato (G6Pt)

A proteina transportadora de Glicose-6-Fosfato é responsável pelo transporte de Glicose 6 Fosfato para tecidos sem cloroplastos, por exemplo neste caso o dreno da cana (entrenós) a partir das folhas. Sendo ela grande responsável pelo armazenamento de energia proveniente dos cloroplastos (FISCHER E WEBERA, 2002). Recentemente um trabalho relacionou a ação das proteínas G6Pt em folhas durante a fase clara e escura da fotossíntese e biossíntese de amido (KUNZ et al., 2010).

Aos 4 meses a proteína G6Pt apresenta uma repressão em resposta a todos os tratamentos exceto a frutose, aos 12 meses apresenta uma repressão em resposta a glicose e manose, Figuras 19 e 20.

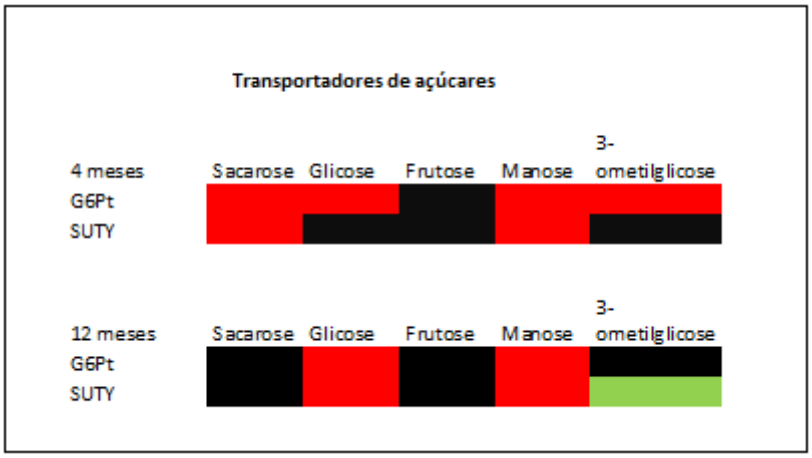


Figura 44 - Perfis de expressão dos transportadores de açúcares, aos 4 e aos 12 meses

Os transportadores de açúcares em questão apresentaram sinalização negativa em resposta à sacarose e manose aos 4 meses e aos 12 meses à glicose e manose Figura 44.

Metabolismo da trealose

Trealose -6- fosfato sintase (TPS)

A trealose 6 fosfato sintase, catalisa o primeiro passo da biossíntese da trealose em plantas (EASTMOND et al., 2002) (Figura 45). Catalisa a tranferência de glicose do UDPG para Glicose- 6-Fosfato para formar a Trealose 6-P, que

corresponde a um poderoso sinal de açúcar para as plantas, pois integra metabolismo com desenvolvimento. E essas funções incluem: desenvolvimento embrionário e foliar, divisão celular, síntese de parede celular, arquitetura de inflorescência, biomassa de mudas, biomassa de plantas adultas e fotossíntese, utilização de sacarose e metabolismo do amido (PAUL et al., 2008).

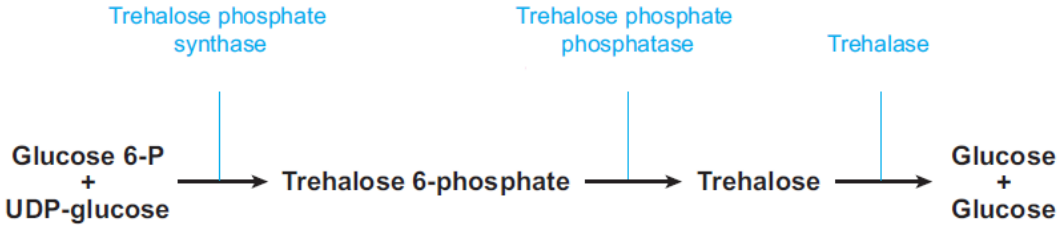


Figura 45 - Via metabólica da trealose

Assim a T6P é sintetizada a partir da G6P e UDPG, que são produtos da quebra da sacarose. A UDPG é produzida diretamente via sacarose sintase, a G6P é produzida a partir da glicose via invertase e hexoquinase ou via frutose e Frutose - 6-P, através da sacarose sintase frutoquinase e fosfoglucose-isomerase (PAUL et al., 2008).

Nas Figuras 19 e 20 é possível observar que nos tratamentos Sacarose e Glicose, aos 4 meses atuam na repressão do gene. No tratamento com manose há efeito de estímulo aos 4 meses e repressão aos 12. Com o tratamento 3-o-metilglicose há um estímulo significativo, e no tratamento com Frutose há uma repressão do gene aos 12 meses.

Trealose-6-fosfato fosfatase (T6Pase)

A trealose-6-fosfato fosfatase cataliza o segundo passo na síntese da trealose. A partir da trealose são produzidas duas moléculas de glicose no cloroplasto, uma será para o armazenamento na forma de amido e a outra será utilizada na fotossíntese para produção de energia (ITURRIAGA et al., 2009).

O perfil de expressão da T6Pase apresenta-se com repressão nos tratamentos sacarose e frutose aos 4 meses e frutose e manose aos 12, com ação de fosforilação por hexoquinases, pelo fato de que a expressão do gene por 3-o-metilglicose não se altera (Figuras 19 e 20).

SNF1 related kinase complex (AMPKBI (5'-AMP-activated protein kinase, beta subunit, complex-interacting region) domain f)- (SNF)

O gene SNF1 corresponde à totalidade da família SNF1 em *S. cerevisae.* Ele é expresso em resposta a baixos níveis de glicose, além de ser requerido para que praticamente todos os genes reprimidos por este açúcar sejam expressos, inclusive aqueles necessários para o crescimento em fontes alternativas de carbono. (CARRARO et al., 2001).

O SNF foi reprimido em resposta a sacarose aos 4 e 12 meses e glicose, frutose e manose aos 12 meses, (Figuras 19 e 20).

Trealose e SNRK *(SNF related Kinase)*

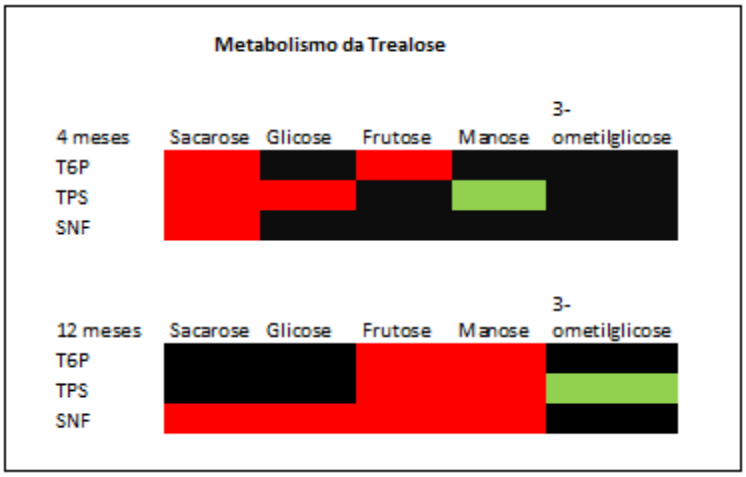


Figura 46 - Perfil de expressão dos genes relacionados ao metabolismo da trealose aos 4 e aos 12 meses

Tal como a sacarose, a trealose é tipicamente produzida em um processo com dois passos. Primeiramente, a síntese da trealose-6-fosfato (T6P) a partir da UDP-glicose e G6P é catalizada por trealose-6-fosfato sintase (TPS; EC: 2.4.1.15). T6P é então desfosforilada à trealose por trealose-6-fosfato fosfatase (T6PP; EC: 3.1.3.12) (ROLLAND et al., 2006). Genes funcionais que codificam a TPS e TPP foram detectados em *Arabidopis* (BLÁZQUEZ et al., 1998, VOGEL et al., 1998; VOGEL et al., 2001).

No entanto, através do perfil de expressão gênica observado que apenas aos 4 meses os genes do metabolismo da trealose e a SNRK estudada apresentaram uma repressão em resposta à sacarose, e aos 12 meses, os três genes foram reprimidos em resposta à frutose e manose (Figura 46).

Síntese de sacarose

Sacarose fosfato sintase

A enzima sacarose-6-fosfato sintase é regulada de diversas maneiras. A glicose-6-fosfato ativa esta enzima e a desfosforilação desta enzima sob a luz também ativa a sacarose-6-fosfato sintase, coordenando a síntese de sacarose com a fotossíntese.

A expressão da sacarose Fosfato Sintase (Figuras 19 e 20) apresentou uma repressão diante dos tratamentos sacarose, glicose, manose e 3-ometilglicose somente aos 12 meses. Isso talvez porque a atividade da SPS é vista como contribuinte para o controle do fluxo da sacarose (FERNIE et al., 2002), o que ocorre apenas em idade adulta. Além disso, a expressão da SPS é regulada por sinais do desenvolvimento, ambientais e nutricionais e por fim em alguns casos, em nível transcricional (WINTER e HUBER, 2000). O que também foi confirmado para outros cultivares C4 como milho e cana-de-açúcar (CHENG et al., 1996; SUGIHARTO et al., 1997).

Sacarose fosfato fosfatase

A sacarose -6 –fosfato fosfatase, é a enzima que fosforila a sacarose -6-fosfato para a produção de sacarose no segundo passo da via da Sacarose Fosfato Sintase.

A sacarose fosfatase, (Figuras 19 e 20), foi reprimida em resposta a todos os tratamentos aos 12 meses e um aumento de expressão com o tratamento manose e repressão em resposta à sacarose aos 4 meses. Em relação aos padrões de expressão em relação à SPS aos 12 meses a sua expressão em resposta à todos os tratamentos exceto a frutose é reprimida, o que pode sugerir que pode haver um sítio combinante da SP na SPS, para uma associação entre SPS e SP (complexo SPS-SP) que pode envolver a canalização da S6P, como foi sugerido por

ECHEVERRIA et al., (1997); LUNN et al., (2000), todavia em uma etapa mais avançada do desenvolvimento, onde a demanda de síntese de sacarose é maior.

Sacarose sintase

Muito se discute a respeito do papel da SUSY como um sistema sensitivo e regulador do desenvolvimento das plantas, tais como a sacarose e seus constituintes (glicose e frutose) atuam não apenas como substratos no metabolismo de carbono, porém como moléculas sinalizadoras para a regulação de diversos aspectos do metabolismo primário das plantas e crescimento (LORETI et al., 2001, ROLLAND et al., 2002; KOCH;,2004; GIBSON, 2005).

A sacarose sintase, (Figuras 19 e 20), apresentou aumento de expressão nos tratamentos com glicose e manose e 3-o-metilglicose aos 4 meses e 3-o-metilglicose aos 12 meses e repressão em resposta aos tratamentos com sacarose, frutose e manose aos 12 meses. No trabalho de MCCORMICK, (2007) e (2008b), apenas 1 das 6 SUSYs estudadas apresentou diferenças significativas de aumento de expressão.

No que tange à síntese de sacarose, aos 4 meses em geral SPS e SP não apresentaram efeitos de expressão, e a SUSY foi estimulada em resposta à Glicose e Manose, talvez porque ela possa responder à esta demanda de síntese direta a partir da glicose. Já aos 12 meses a resposta é negativa em relação à sacarose, frutose e manose, indicando uma repressão por meio dos excessos de produtos e substratos, para sua inibição enzimática.

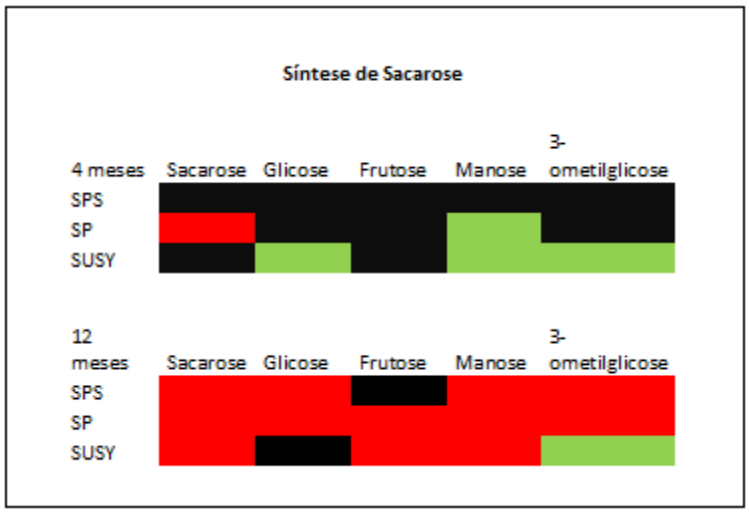


Figura 47 - Perfil de expressão dos genes relacionados à síntese de Sacarose aos 4 e aos 12 meses

Os genes envolvidos no metabolismo de síntese de sacarose, SP e SUSY apresentaram aumento de expressão em resposta à manose, aos 4 meses. Já aos 12 meses SPS, SP e SUSY apresentaram repressão na expressão em resposta à sacarose e manose, SPS e SP em resposta à glicose e SP e SUSY em resposta à frutose Figura 47. Sendo os 3 açúcares sinalizadores desta via nesta etapa do desenvolvimento.

Síntese de sacarose e SNRK *(SNF Related Kinase)*

Como já se afirmou anteriormente, existem dois tipos de proteínas quinases relacionadas à SPS, uma SNF1-related protein Kinase (SNRK1) que é nomeada assim, devido a sua alta similaridade à SNF1 (Sucrose non Fermenting) de leveduras, e uma calmodulina-like protein kinase (CPDK) (WINTER e HUBER, 2000). Em outro estudo detalhado por Huang e Huber (2001) demosntrou que a SPS de dicotiledôneas é primariamente ativada por uma SNRK1 e uma CDPK que poderiam fosforilar a SPS de monocotiledôneas.

Assim nas análises posteriores tentou-se identificar relações dentre a expressão da SNF- Related Kinase escolhida e os genes relacionados ao metabolismo de síntese de sacarose Figura 48.

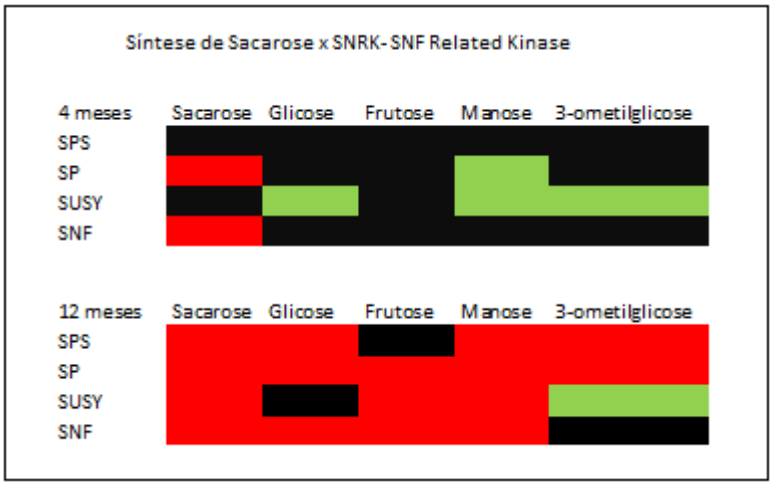


Figura 48- Perfil de expressão dos genes relacionados à síntese de sacarose x *SNF related kinase* entre 4 e 12 meses

Aos 4 meses a SNF apresentou expressão similar à SP em resposta à sacarose, aos 12 meses também apresentou alta similaridade com a SP em resposta à todos os tratamentos aplicados exceto à 3-o-metilglicose, o que indica que o tipo de sinalização da SP é independente de hexoquinases, e o tipo de

sinalização para SNF é dependente de hexoquinases nesta etapa do desenvolvimento. Todavia aos 12 meses sua sinalização é similar também aos genes SPS exceto para o tratamento com frutose, e para a SUSY exceto em resposta ao tratamento com Glicose, o que pode indicar uma relação desta proteína com a síntese de sacarose, visto que para este tratamento a sinalização desencadeia uma resposta de expressão gênica idêntica para os 4 genes.

Efeitos sinalizadores e metabolismo

Sinalização mediada por hexoquinase

Em geral observa-se que a planta aos 4 meses possui respostas de sinalização menos significativas do que aos 12 meses. E que em geral os tratamentos com açúcares atuaram de maneira repressora na expressão dos genes estudados exceto para o tratamento 3-o-metilglicose aos 12 meses, e os genes SP, TPS em resposta à manose e a SUSY em resposta à glicose, manose e 3-ometilglicose, aos 4 meses. E INPYR em resposta à Frutose e Manose aos 12 meses.

As diferenças significativas de expressão dos genes em resposta ao 3-o-metilglicose, que corresponde ao controle experimental de fosforilação por hexoquinases, indicam que há sinalização direta da maioria dos genes sem necessidade de fosforilação dos açúcares por hexoquinases para a sinalização dos açúcares glicose e manose, que correspondem a açúcares substratos de hexoquinase por serem epímeros, sendo que aos 4 meses INPYR, SP e SUTY sinalização dependente de hexoquinases para o tratamento manose, TPS apresenta sinalização dependente de HXK para os dois açúcares. Aos 12 meses T6P apresenta sinalização dependente de HXK para o tratamento manose, e FBA para o tratamento glicose, e G6Pt e SNF para ambos os tratamentos Figura 49.

A dependência de sinalização por hexoquinase não se manteve constante dentre as idades, no entanto é possível observar que os resultados mostram evidências de que no metabolismo da trealose a TPS possui sinalização por glicose e manose aos 4 meses mediada por hexoquinases o que condiz com o que já foi afirmado na literatura por ITURRIAGA et al., 2009, e a T6P aos 12 meses possui sinalização por manose dependente de hexoquinases, o que não condiz com o que já havia sido afirmado por EASTMOND e GRAHAM, 2003. No entanto, observa-se que a sinalização se inverte entre as idades, o que significa que a sinalização

mediada por hexoquinases não se mantém constante durante o desenvolvimento da planta para nenhum dos genes analisados.

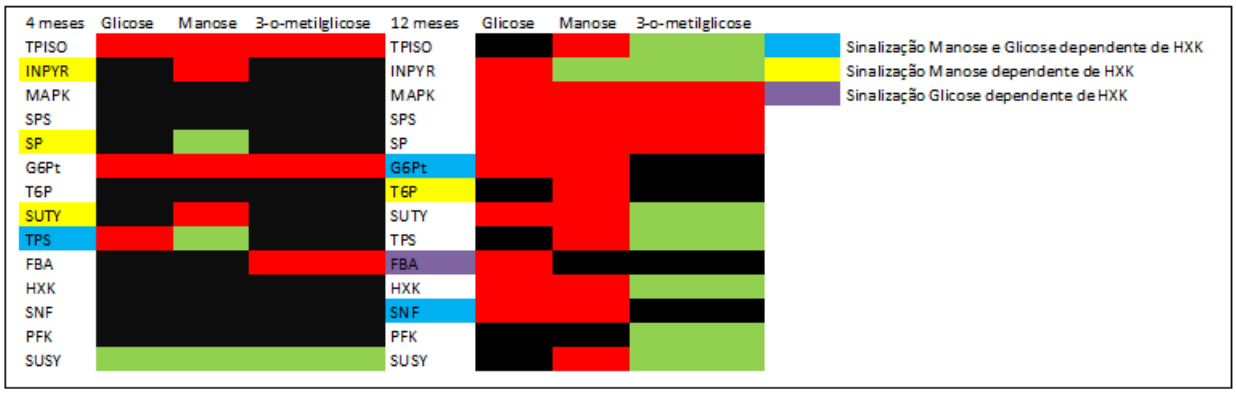


Figura 49 - Análise das respostas de sinalização através da fosforilação por hexoquinase dos açúcares, em resposta aos tratamentos glicose e manose (substratos para ação de hexoquinases) utilizando-se do controle 3-o-metilglicose aos 4 e 12 meses

Através de correlações entre as sinalizações obtidas é possível investigar o papel dos açúcares como sinalizadores na expressão dos genes analisados.

Sinalização de hexoses

Em relação às hexoses aplicadas nos tratamentos (Glicose, Frutose e Manose), aos 4 meses o gene TPiso apresenta o mesmo padrão de resposta de expressão diante das 3 hexoses, já os genes G6Pt e SUSY apresentam o mesmo padrão de resposta de sinalização para glicose e manose, e o gene TPS apresenta sinalização oposta para os mesmos açúcares. Nesta etapa do desenvolvimento T6P e FBA apresentam respostas exclusivas à frutose e SP e SUTY apresentam respostas exclusivas à manose (Figura 50).

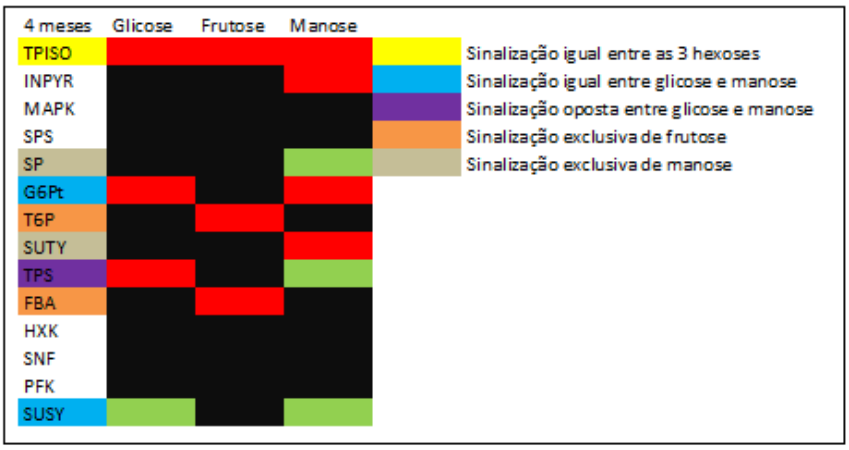


Figura 50 - Relação padrões de expressão via sinalização das hexoses: glicose, frutose e manose aos 4 meses

Já aos 12 meses o padrão se altera MAPK, SP, HXK e SNF apresentam respostas de expressão iguais para as 3 hexoses. SPS, G6Pt e SUTY apresentam respostas iguais para glicose e manose. Já T6P, TPS, SUSY e INPYR apresentam sinalização igual entre frutose e manose, sendo o último gene com este padrão oposto à sua expressão em resposta à glicose. E o gene FBA torna-se exclusivo de glicose e TPISO de manose (Figura 51).

Figura 51 - Relação padrões de expressão via sinalização das hexoses: glicose, frutose e manose aos 12 meses

Sinalização dissacarídeo *versus* monossacarídeos (Componentes)

Além disso, é possível analisar, as relações entre o dissacarídeo (sacarose) e seus monossacarídeos componentes (glicose e frutose) em seus padrões de expressão gênica.

Aos 4 meses o gene que apresenta o mesmo padrão de sinalização para os três açúcares é o TPISO. Já a sinalização igual entre sacarose e glicose ocorre em G6Pt e TPS, a sinalização igual para sacarose e frutose ocorre para T6Pase. A sinalização é exclusiva para sacarose nos genes INPYR, SP, SUTY, HXK, SNF e PFK, para frutose a sinalização é exclusiva apenas para FBA, e para glicose apenas para SUSY (Figura 52).

Figura 52 – Relação padrões de expressão via sinalização de dissacarídeo (sacarose) *versus* monossacarídeos componentes (glicose e frutose) aos 4 meses

Aos 12 meses esse padrão se altera MAPK, SP, HXK e SNF passam a ter expressão responsiva aos três açúcares. Para sacarose e glicose os genes responsivos igualmente são SPS, FBA e INPYR; sendo o último, com essa expressão oposta ao tratamento frutose. Para sacarose e frutose o gene igualmente responsivo foi a SUSY.

Quanto às repostas exclusivas a sacarose, este tratamento aos 12 meses apenas influenciou exclusivamente o gene TPISO, já a glicose passou a influenciar G6Pt e SUTY e a frutose influenciou T6P e TPS, (Figura 53), padrão que se alterou ao longo do desenvolvimento, visto que a sacarose apresentou uma influência exclusiva bem maior aos 4 meses o que podemos relacionar com a relação fonte-drendo de cana-de-açúcar descrita por (CHAMBRA et al., 2011) em que as folhas jovens comportam-se como dreno, sofrendo influência maior da sinalização da sacarose, e as folhas adultas comportam-se como fonte, e essa sinalização por sacarose se altera.

Figura 53 – Relação padrões de expressão via sinalização dissacarídeo (sacarose) *versus* monossacarídeos componentes (glicose e frutose) aos 12 meses

Sinalização dissacarídeo *versus* monossacarídeo (não componente)

É possível relacionar por fim a sinalização da sacarose (dissacarídeo) com a sinalização da manose (monossacarídeo não componente do dissacarídeo analisado e epímero da glicose), e correspondeu a um sinal externo e competitivo, por ser um sequestrador de ortofosfato citoplasmático e sua administração em folhas ser conhecido por causar alterações no metabolismo do carbono da planta (HEROLD et al., 1976).

Aos 4 meses observa-se uma sinalização no mesmo padrão para ambos os açúcares para TPISO, INPYR, G6Pt e SUTY. Para SP e TPS essa sinalização é oposta. E para T6P, HXK SNF, PFK são sinalizadas exclusivamente por sacarose e SP e a SUSY por manose (Figura 54).

Figura 54 – Relação padrões de expressão via sinalização dissacarídeo (sacarose) *versus* Monossacarídeo não componente (manose) aos 4 meses

Aos 12 meses para TPISO, MAPK, SPS, SP, HXK, SNF e SUSY a sinalização apresenta o mesmo padrão de expressão. Apenas para INPYR essa sinalização é oposta. Já para os genes G6Pt, T6P, SUTY e TPS são responsivos somente à manose, e apenas FBA é responsivo somente à sacarose, padrão que se alterou ao longo do desenvolvimento, visto que mais genes eram responsivos somente à sacarose aos 4 meses(Figura 55).

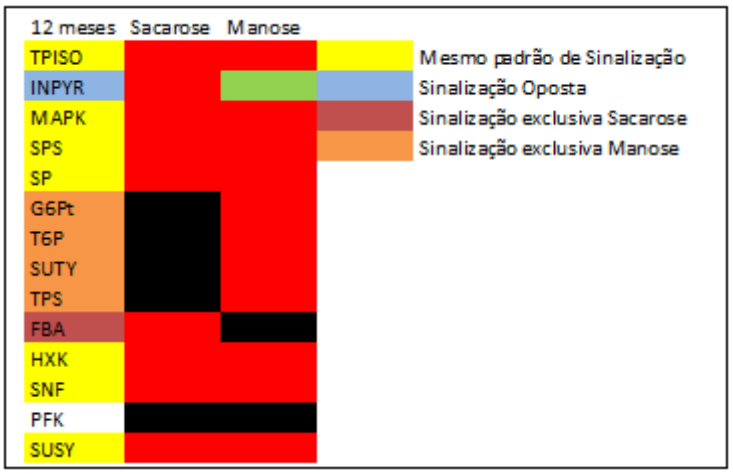


Figura 55 – Relação padrões de expressão via sinalização dissacarídeo (sacarose) *versus* monossacarídeo não componente (manose) aos 12 meses

Obviamente existem flutuações entre os padrões de expressão e sinalização dos genes ao longo do desenvolvimento da planta, e de acordo com as necessidades metabólicas de cada estádio de seu desenvolvimento.

Construção da via de ação dos genes analisados e análise dos perfis entre-idades

A partir dos genes estudados foi possível construir uma via do metabolismo com todos os genes estudados e os efeitos dos açúcares testados Figura 56, a fim de se visualisar com mais clareza a interação dos genes analisados entre si, e suas correspondências a partir de evidências encontradas na literatura. Em geral, os genes estão com alta expressão ao longo do desenvolvimento.

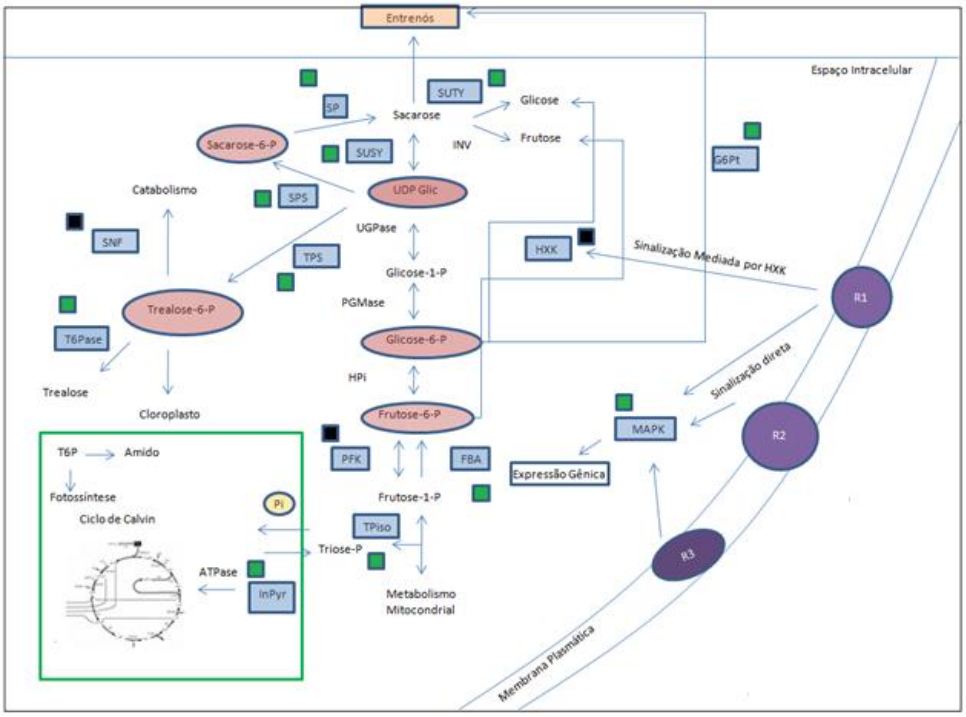


Figura 56 - Perfil de expressão gênica ao longo do desenvolvimento da planta entre 4 e 12 meses, amostras tratadas com água, amostras de 4 meses como controle. Caixas em verde aumento de expressão no material de 12 meses, caixas em preto: diferenças de expressão não significativas

Assim construimos dois perfis de expressão gênica, para os padrões de sinalização de açúcares entre os tratamentos aplicados um para 4 meses Figura 57 e outro para 12 meses Figura 58.

Aos 4 meses a sacarose atua como repressor da expressão das enzimas glicolíticas TPiso, PFK e HXK, da enzima do metabolismo de síntese de sacarose SP, atua reprimindo todas as enzimas do metabolismo da trealose TPS, T6Pase e SNF; reprime o gene sinalizador InPYR e reprime os transportadores de açúcares SUTY e G6Pt. Já a glicose atua reprimindo a enzima glicolítica Tpiso, estimula a SuSy no metabolismo de síntese de sacarose, reprime apenas a TPS no metabolismo da trealose e atua também como repressor no gene transportador G6Pt. E a frutose atua na repressão do gene glicolítico TPiso, não causa mudanças de expressão gênica no metabolismo de síntese de sacarose, atua na repressão da TPS e T6P no metabolismo de trealose e não possui efeitos sobre os transportadores de açúcares e genes sinalizadores (Figura 57).

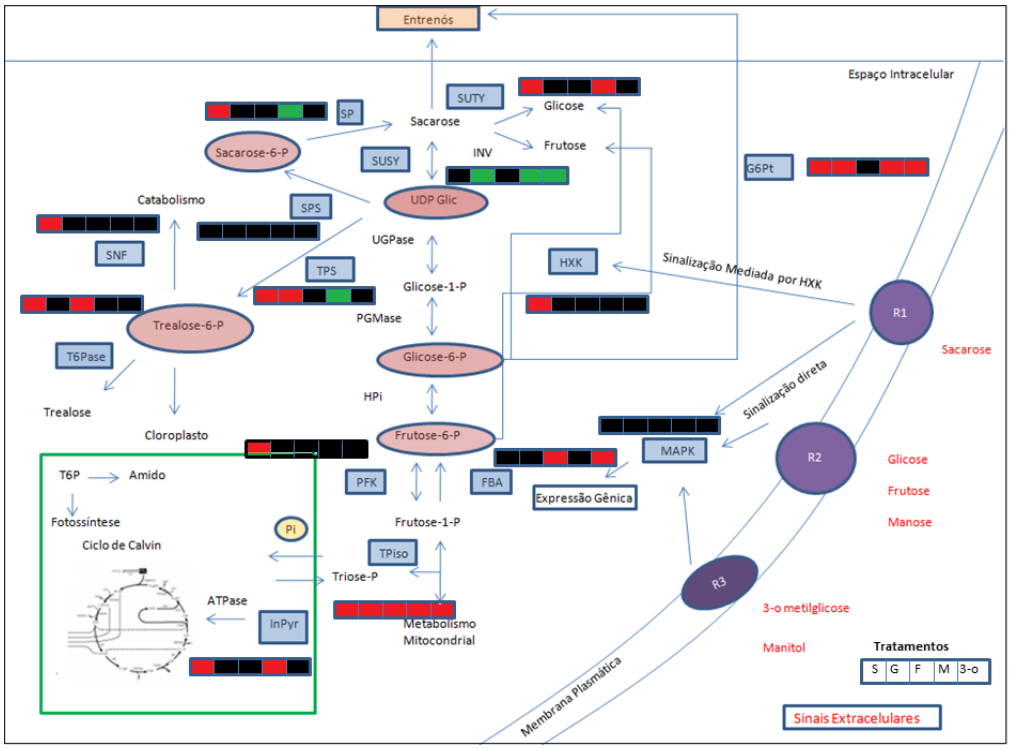


Figura 57 - Via Representando o ensaio de sinalização através dos tratamentos extracelulares com açúcares exógenos (em vermelho) que atravessam a membrana plasmática através dos receptores de membrana R1, R2 e R3 e os seus efeitos nos genes das enzimas estudadas (caixas em azul). Perfil de expressão gênica aos 4 meses. Tratamentos indicados nas caixas: S (sacarose), G (glicose), F (frutose), M (manose), 3-o (3-ometilglicose). Caixas em verde aumento de expressão, caixas em vermelho, repressão da expressão e caixas em preto sem alterações significativas

Aos 12 meses a sacarose atua como repressor das enzimas glicolíticas TPiso, FBA e HXK, em todas as enzimas do metabolismo de síntese de sacarose SUSY, SP e SPS, na SNF no metabolismo de trealose, e na repressão dos genes sinalizadores MAPK e InPYR, não causando alterações na expressão dos genes transportadores de açúcares. Já a glicose atuou na repressão das enzimas glicolíticas FBA e HXK, SPS e SP no metabolismo de síntese de sacarose, na repressão da SNF no metabolismo de trealose, dos genes sinalizadores MAPK e InPYR e na repressão dos transportadores de açúcar SUTY e G6Pt. E a frutose atuou na repressão da HXK na glicólise, SP e SUSY na síntese de sacarose, todos os genes do metabolismo da trealose, TPS, T6Pase e SNF, estímulo do gene sinalizador InPYR e repressão do gene MAPK, e não apresentou efeito sobre os genes transportadores de açúcares (Figura 58).

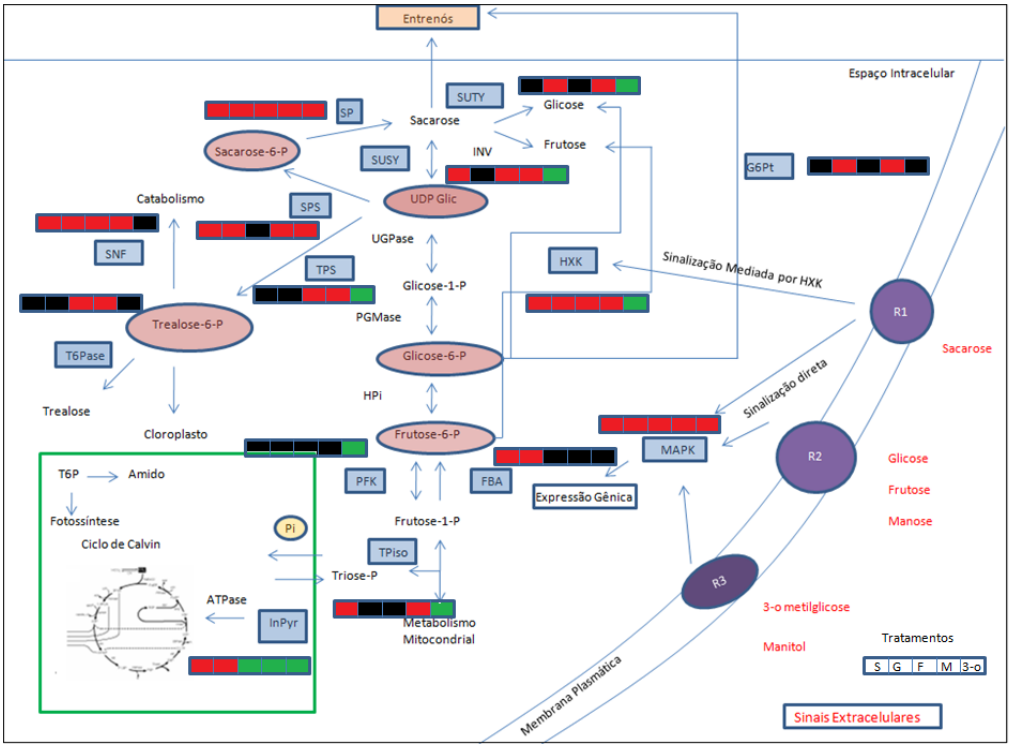


Figura 58 - Via representando o ensaio de sinalização através dos tratamentos extracelulares com açúcares exógenos (em vermelho) que atravessam a membrana plasmática através dos receptores de membrana R1, R2 e R3 e os seus efeitos nos genes das enzimas estudadas (caixas em azul). Perfil de expressão gênica aos 12 meses. Tratamentos indicados nas caixas: S (sacarose), G (glicose), F (frutose), M (manose), 3-o (3-ometilglicose). Caixas em verde aumento de expressão, caixas em vermelho, repressão da expressão e caixas em preto sem alterações significativas

Tal ação repressora dos açúcares na maioria dos genes e idades do ensaio, vai de encontro com o que já foi afirmado por (BOLOURI-MOGHADDAM et al., 2010), em que determinou-se em nível celular que a glicose em excesso atua como repressor transcricional. No entanto, para cada gene esta ação é dependente da concentração do açúcar, como foi evidenciado para os genes SUSY aos 4 meses em resposta à glicose e manose, TPS e SP em resposta à manose e INPYR aos 12 meses em resposta à glicose e frutose, os quais esta concentração experimental desencadeou um aumento na expressão gênica. Isso indica, que são necessários mais estudos para se identificar a concentração ótima de sinalização positiva dos genes a serem estudados.

6.2 Metabolômica

Metabólitos primários identificados em folhas de cana-de-açúcar

A partir dos ensaios realizados foi possível obter 70 metabólitos componentes do metabolismo primário (Tabela 3), dentre as classes: aminoácidos, ácidos graxos, fenóis e açúcares (Figura 21). E, a partir dos resultados obtidos, através dos PCAs foi possível separar os metabólitos entre as idades (Figuras 23 e 24), porém não entre todos os tratamentos aplicados (Figuras 27 e 28), sendo os tratamentos: sacarose e frutose os únicos que apresentaram diferenças temporais.

Metabólitos diferenciais ao longo do desenvolvimento da planta

Para as análises das mudanças ocorridas dentre os tratamentos por idade, utilizou-se ferramentas estatísticas do software R e o limiar estabelecido através do algorítimo HT-Self, de 30% para identificação dos metabólitos diferenciais.

Na primeira etapa destas análises, buscou-se identificar, os metabólitos alterados de acordo com o desenvolvimento da planta, assim comparou-se os metabólitos das amostras sem tratamento (apenas coletadas e congeladas) de 4 e 12 meses, utilizando 4 meses como controle. Identificaram-se 11 metabólitos, (Figura 59) sendo que 10 apresentaram uma diminuição significativa em sua concentração, ao contrário do padrão que se observou dentre os genes escolhidos para o estudo; e 1 (ácido quínico) apresentou aumento significativo em sua concentração Figura 32.

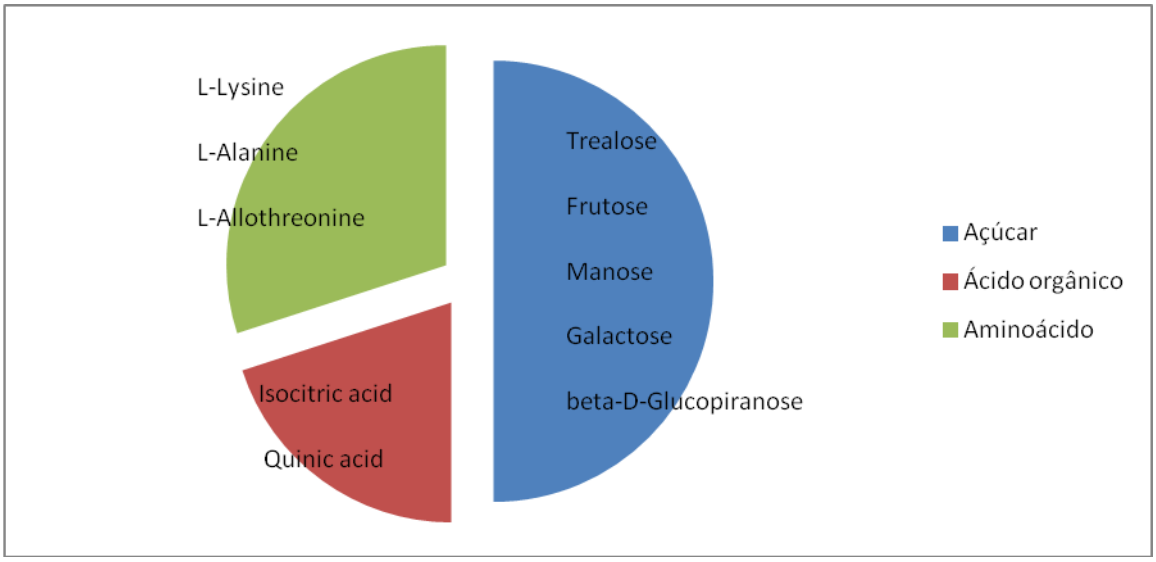


Figura 59 - Metabólitos diferenciais identificados entre 4 e 12 meses

Dentre os açúcares identificados, todos apresentaram uma alta redução ao longo do desenvolvimento da planta, de 50% para Manose e de 100% para os demais açúcares: Trealose, Frutose, Galactose e Beta-D-Glucopiranose.

A manose corresponde a um açúcar que como já foi relatado na literatura, não costuma ser fácilmente identificado nas plantas, corresponde a um epímero C2 da glicose, é um monômero de açúcar de uma série de carboidratos aldohexoses (HEROLD e LEWIS, 1977; HARRIS,1986). A Trealose é um dissacarídeo formado por duas glicoses e está altamente relacionado com a sacarose nos processos de sinalização de açúcares relatados na literatura (ROLLAND et al., 2006). Frutose, monossacarídeo. Galactose, monossacarídeo, substrato utilizado na síntese de polissacarídeos não celulósicos e glicoproteínas (NASSAU et al., 1996). Beta-D-Glucopiranose, monossacarídeo, componente da lactose (KEGG, 2012).

Dentre os aminoácidos identificados: Alanina, Lisina e Treonina, os dois primeiros apresentaram redução de 30% e para a treonina a redução foi de 40%. A alanina é produzida a partir da aminação redutiva do piruvato. Isso porque as reações de transaminação podem ser prontamente formadas e, além disso, possuem ligações com vias tais como da glicólise, gluconeogênese e ciclo de Krebs. Ela também surge com lactato e gera glicose a partir de proteínas via o ciclo da alanina (NELSON E COX, 2005;). A Lisina, produzida nas plantas através da via do ácido aspártico. Relatos recentes revelaram que a degradação da lisina pode estar relacionada com vários processos fisiológicos, por exemplo, crescimento,

desenvolvimento e respostas às mudanças ambientais e estresses (FORNAZIER et al., 2003). E a Treonina, atua como promotora do crescimento (NELSON E COX, 2005).

Em relação aos ácidos orgânicos o ácido isocítrico apresentou redução de 30% e o Ácido quínico com aumento de 100%. Ácido Isocítrico: Substância do ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido cítrico). O isocitrato é formado a partir do citrato com o auxílio da enzima aconitase e é ativado através da isocitrato desidrogenase. Sais e ésteres de ácido isocítrico são conhecidos como isocitratos (KEGG, 2012; NELSON E COX, 2005). O ácido quínico: é um ciclitol, ou seja, um poliol cíclico. É um ácido cristalino obtido de plantas. É um tipo de tanino, que são moléculas indispensáveis na defesa da planta a ataques de pragas (KEGG, 2012; NELSON E COX, 2005).

Esses metabólitos estão diretamente relacionados com as mudanças que ocorrem no metabolismo da planta durante seu desenvolvimento.

Ensaio de sinalização de açúcares: efeito osmótico em cana-de-açúcar

Assim como para expresão gênica, analisou-se os efeitos osmóticos sob as alterações metabólicas dentre os controles água (experimental) e manitol (osmótico) entre as idades 4 e 12 meses, (Figuras 33 e 34). Para o controle experimental água foram identificados 7 metabólitos: Ácidos orgânicos: Ácido glicérico, Ácido glutâmico e Ácido quínico, açúcares: Frutose, Galactose, Trealose e Galactinol.

O ácido glicérico é um açúcar ácido C3- sais e ésteres: gliceratos. Seus derivados fosfatos são intermediários da glicólise (KEGG, 2012; NELSON E COX, 2005). Ácido Glutâmico: Ácido- cujos sais são os Glutamatos e estão relacionados ao crescimento das plantas. Galactinol: açúcar conjugado de mio-inositol e galactose (KEGG, 2012; NELSON E COX, 2005).

Sendo que os metabólitos, Frutose, Galactose e Trealose apresentaram-se iguais aos padrões identificados para as amostras sem tratamento, com excessão para o ácido quínico, que ao invés de ter diminuído, aumentou 100% para o tratamento água entre as idades.

Para o controle osmótico manitol os metabólitos identificados entre as idades também foram sete: Os ácidos orgânicos: Ácido Glicérico: redução de 30%, Ácido Glutâmico: aumento de 40%, Ácido Isocítrico: aumento de 30%, Ribitol: redução de

30%; aminoácido: alanina: redução de 30%, o açúcar Trealose: redução de 100% e Fosfato inorgânico com redução de 30%.

O Ribitol corresponde a um ácido orgânico derivado do pentano com 5 hidroxilas: pentan-1,2,3,4,5-pentol (KEGG, 2012; NELSON E COX, 2005).

Os metabólitos: Ácido Glicérico, Ácido Glutâmico e Trealose, não apresentaram diferenças dentre os controles água e manitol. Já os metabólitos: alanina apresentou um padrão semelhante ao das amostras sem tratamento, e o ácido isocítrico, o qual nas amostras sem tratamento apresenta-se oposto talvez por efeito osmótico.

Os metabólitos Ribitol e Fosfato Inorgânico, os quais se apresentaram diferenciais, podem estar relacionados a um efeito osmótico desencadeado pelo controle manitol. E o açúcar Trealose que se manteve constante em todas as condições das análises demonstra-se um metabólito indispensável para o desenvolvimento da planta ao longo de seu desenvolvimento. Sendo que a trealose já foi previamente identificada nos trabalhos de BOSCH et al., 2003 para entrenós de plantas adultas (12 meses), e no trabalho de GLASSOP et al., 2007 foi determinado como abundante no tecido meristemático e nos entrenós imaturos, sendo menos abundante nos entrenós mais maduros (em plantas de 7 meses), o que se pode correlacionar com esta redução de abundância apresentada ao longo do desenvolvimento da planta.

Sinalização de açúcares: metabolitos diferenciais

Aos 4 meses em relação ao controle osmótico Manitol houveram 3 metabólitos diferenciais, Figura 35: os açúcares Glicose-6-Fosfato com redução de 100% e Galactose com redução de 50%, e o ácido graxo vegetal: ácido alfa-linoleico com aumento de 30%, todos no tratamento com manose.

Utilizando o controle experimental água houve uma quantidade maior de metabólitos diferenciais, sete metabólitos: Figura 36. Os ácidos orgânicos: ácido fosfórico, ácido glicérico ou glicerato, ácido L-glutâmico, com redução de concentração, os açúcares: Glicose-6-Fosfato, com redução de 50%, manose com aumento de 30%, no tratamento com manose; e a beta-D-Glucopiranose ou Galactose com redução de 40% no tratamento com frutose, e o aminoácido Serina com redução de 40% no tratamento com manose.

O único metabólito que foi diferencial nas duas condições de controle foi a Glicose-6-Fosfato para o tratamento com manose. Que corresponde a um metabólito crucial nas vias de síntese de sacarose e atua na relação fonte-dreno, pois a Glicose-6-Fosfato pode ser transportada das folhas para os entrenós para a síntese de sacarose. Nos trabalhos de BOSCH et al., (2003) em plantas de 12 meses e GLASSOP et al., (2007) em plantas de 7 meses; foi identificado como diferencial e no segundo trabalho para entrenós e tecidos meristemáticos este metabólito apresentou-se altamente abundante no meristema e no entrenó 9 e pouco concentrado nos entrenós intermediários, demonstrando esta possível relação fonte-dreno.

Aos 12 meses utilizando o controle osmótico Manitol foram identificados 5 metabólitos diferenciais: Figura 37, foi possível identificar, o ácido orgânico: Ácido Málico, Fosfato, (no tratamento com sacarose) com aumento de 30%, os aminoácidos: Valina com aumento de 100% e L-Allotreonina com aumento de 40%; e o ácido orgânico L-ácido Glutâmico com redução de 50%, no tratamento com manose.

Utilizando o controle experimental água identificaram-se 9 metabólitos diferenciais: Figura 38. Os aminoácidos: Valina, Treonina Lisina e Fenilalanina com aumentos entre 30% e 50%, para o tratamento com manose. Os açúcares, Manose com aumento de 50% para o tratamento manose, Frutose com aumento de 40% para o tratamento Frutose e Glicose-6-Fosfato com redução de 100% para o tratamento Manose.

Os únicos metabólitos diferenciais e no mesmo padrão para ambos os controles, água e manitol, foram a L-Alotreonina, Valina e o ácido L-Glutâmico.

A L-Alotreonina ou treonina é um aminoácido que está relacionado ao metabolismo primário e dá origem ao ácido pirúvico que pode formar tanto glicose como acetil-CoA na glicólise (KEGG, 2012; NELSON E COX, 2005). O ácido glutâmico ou glutamato é um aminoácido que também atua na glicólise na produção de metabólitos como o piruvato ou oxalacetato (KEGG, 2012; NELSON E COX, 2005).

Os metabólitos Manose e Glicose-6-Fosfato, foram identificados para 12 meses utilizando o controle experimental água, e se assemelham ao que foi identificado para 4 meses. Portanto, os efeitos de sinalização sobre a Glicose-6-Fosfato ocorrem de maneira significativa na planta aos 4 meses.

Aos 12 meses há uma quantidade maior de metabólitos diferenciais do que aos 4 meses, e ainda observa-se uma tendência de metabólitos diferenciais acima do limiar em maior proporção para 12 meses enquanto que para 4 meses os metabólitos diferenciais possuem tendências de estarem abaixo do limiar.

A manose corresponde ao tratamento pelo qual se apresentou uma maior quantidade de metabólitos diferenciais, talvez porque a manose corresponda a um açúcar componente essencial dos açúcares presentes em cana-de-açúcar, por isso para as análises posteriores retirou-se a manose das análises para se observar os metabólitos diferenciais entre os outros tratamentos.

Aos 4 meses o único metabólito diferencial utilizando o controle experimental água, em resposta à Frutose foi o Beta-D-Glucopiranose com redução de 30% (Figura 39). Aos 12 meses, utilizando o controle água identificou-se 5 metabólitos diferenciais, sendo que 3 não são identificados, e os outros 2 são ácido hidrobenzóico no tratamento glicose com redução de 30% e Frutose no tratamento frutose de 40% (Figura 40). E com o controle osmótico manitol, foram identificados dois metabólitos diferenciais, ácido málico e fosfato inorgânico em resposta á sacarose com aumento de 30% (Figura 41). Nenhum metabólito se diferenciou igualmente diante dos dois controles experimental e osmótico utilizados, portanto não se pode afirmar qual metabólito de fato são produtos da sinalização dos açúcares experimentais, ou do efeito osmótico da solução aplicada durante os tratamentos.

As mudanças no metabolismo primário observadas neste ensaio foram sutis, e poucos metabólitos significativamente diferenciais foram identificados, sendo que estes eram altamente susceptíveis, às alterações das condições de análise. Foram identificados muitos metabólitos semelhantes ao único trabalho prévio de metabolismo primário de folhas de cana-de-açúcar com amostras cultivadas em atmosfera rica em CO_2 ao longo de 24h, (SOUZA, 2011), no entanto, ao longo das análises, de acordo com os tratamentos aplicados, diferentes metabólitos apresentaram alterações significativas. Assim como, ocorreu para as análises realizadas entre entrenós e tecidos meristemáticos, (GLASSOP et al., 2007).

Ainda há muito para se elucidar sobre a técnica de identificação de metabólitos e a análise de suas mudanças, visto que, no presente ensaio e nos ensaios até então publicados, utiliza-se de ferramentas estatística de modo a se analisar as mudanças estatisticamente significativa dos metabólitos, no entanto, não

se sabe ao certo como as concentrações e configurações dos metabólitos influenciam o metabolismo em geral, e a necessidade utilização de técnicas robustas para se confirmar estas alterações como se discute no trabalho de FERNIE e STITT, 2012.

Reconfiguração metabólica dentre os tratamentos experimentais

Utilizando a ferramenta Heat Map do software R foi possível observar a organização dos metabólitos em resposta à cada tratamento aplicado e quais as intensidades observadas.

Na análise realizada com as amostras sem tratamentos entre as idades 12 e 4 meses, (Figura 29) foi obtido um interessante resultado, sendo que a taxa de abundância dos metabólitos primários identificados apresentaram-se completamente opostas entre as idades o que confirma essa alteração de papel que a folha sofre ao longo do desenvolvimento, de drento para fonte.

Aos 4 meses (Figura 31), a Glicose é o tratamento diferencial (com maiores taxas de alterações de abundância entre os metabólitos), seguida por 3-o-metilglicose, Manose, água (que está localizado no centro da figura) o que é interessante por ser considerado o controle experimental, seguido por frutose, manitol e sacarose. Já aos 12 meses (Figura 30), a Manose é o tratamento pelo qual houve maiores alterações de abundância entre os metabólitos identificados, seguido de sacarose e manitol, (que estavam localizados no final da figura 30 para 4 meses) e passam a ter maior diferenciação aos 12 meses, devido ao aumento de produção de sacarose, e aumento da susceptibilidade da planta aos efeitos osmóticos ambientais; água (tratamento central), seguido de glicose, 3-ometilglicose, tratamentos que tornaram-se pouco diferenciais aos 12 meses e frutose.

Através das informações obtidas pelo software R e as vias identificadas pelo banco de dados KEGG, 2012 foi possível construir um modelo de metabolismo primário para folhas de cana-de-açúcar com os metabólitos identificados no presente projeto Figura 60. Para os perfis metabólicos por tratamento aplicado e controles utilizados consultar o ANEXO B.

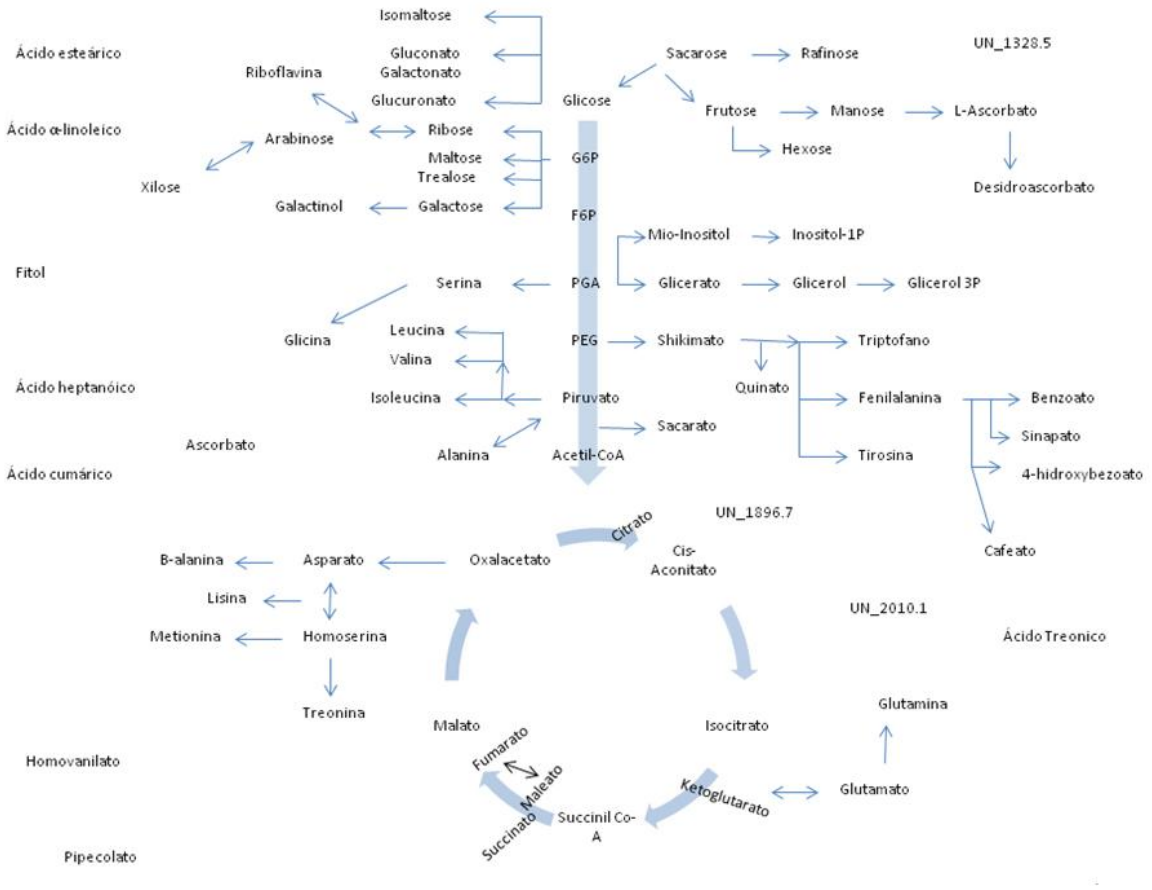


Figura 60 - Mapa do metabolismo primário de folhas obtido no presente projeto

6.3 Expressão gênica e metabolômica

Um grande desafio para a pesquisa atual corresponde à dificuldade em se integrar os dados obtidos de ensaios de expressão gênica com dados em larga escala de metabólitos, como efetuado no presente projeto. No artigo recém-publicado “Omics Discord” (FERNIE e STITT, 2012) trata da discordância dos dados obtidos a partir de ensaios de transcriptômica, proteômica e metabolômica dentre os quais há muitas dificultades ao se interpretar e relaciona-los biologicamente. Sendo que ainda existem gargalos a serem superados no estabelecimento de protocolos robustos para metabolômica para documentar e assegurar os dados obtidos.

Assim no presente projeto para se correlacionarem os resultados obtidos entre os perfis dos transcritos e dos metabólitos obtidos se seguirá a mesma linha de raciocínio das análises anteriores, primeiro a análise dentre as duas idades experimentais, isto é ao longo do desenvolvimento; e depois, a ação da sinalização dos açúcares experimentais dentre as idades.

Perfil ao longo do desenvolvimento da planta

A trealose foi o metabólito que apresentou diferenças significativas em redução de abundância ao longo do desenvolvimento da planta, pois se apresentou constante entre as 3 análises realizadas e não sofreu influências do efeito osmótico. O metabolismo da trealose corresponde a uma das vias mais interessantes no que se refere à sinalização de açúcares ao longo do desenvolvimento da planta (RAMON e ROLLAND, 2007; EVELAND e JACKSON, 2011), e até mesmo à resistência hídrica/osmótica da cana-de-açúcar (ITURRIAGA et al., 2009 e SILVA et al., 2011). E seu potencial como metabólito chave em cana-de-açúcar vem sendo explorado desde o trabalho de (BOSCH et al, 2003 e GLASSOP et al., 2007) em entrenós e tecidos meristemáticos.

Ao longo do desenvolvimento da planta os genes da via da trealose a trealose-6-fosfato sintase: TPS e a trealose-6-fosfato fosfatase T6P aumentam de expressão, o que se faz refletir sobre o resultado da redução de concentração do metabólito trealose, já que esta pode não ser sentida no metabolismo primário de forma positiva, mas na sua forma fosforilada: trealose-6-fosfato, levando a redução da concentração da trealose em sua forma livre.

Ao longo do desenvolvimento os genes escolhidos apresentaram um aumento de expressão significativo, enquanto que os metabólitos significativamente diferenciais identificados ao longo do desenvolvimento tendem a diminuir em concentração (para visualizar tal relação Figura 61).

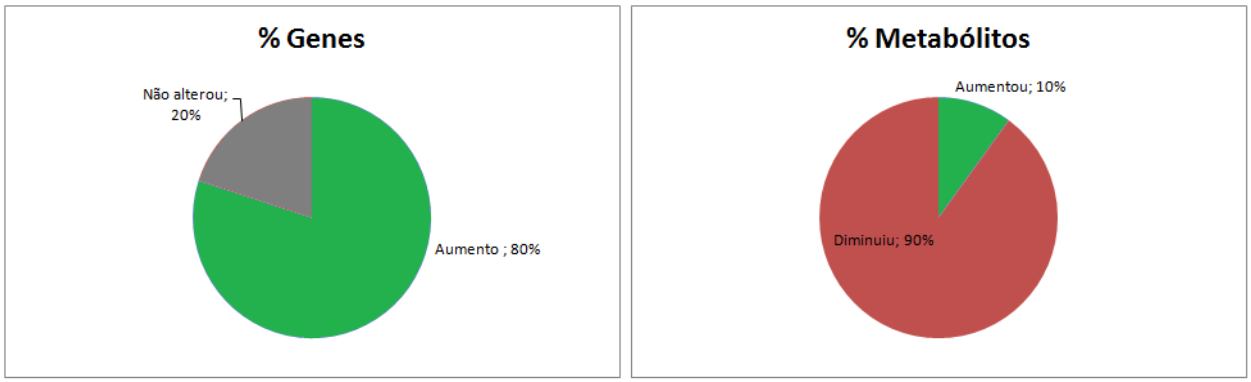


Figura 61 - Porcentagem de aumentos e diminuição da expressão dos genes significativamente diferenciais e da abundância dos metabólitos significativamente diferenciais ao longo do desenvolvimento

Perfil em resposta aos tratamentos de sinalização de açúcares

O tratamento que apresentou a grande maioria dos metabólitos diferenciais e alto efeito de expressão gênica foi a manose, pois se trata de um açúcar que possui alto efeito quando aplicado exógenamente em folhas, que atua como sequestrador de ortofosfato citoplasmático quando fosforilada por hexoquinase formando manose-6-fosfato, que entra lentamente no ciclo glicolítico (SMEEKENS et al., 2000), causando inclusive a repressão da produção de glicose 6-P e redução de ATP (KLEIN and STITT, 1998) e apresenta efeito diferencial no metabolismo de carbono em plantas.

Aos 4 meses a Glicose-6-Fosfato é o único metabólito diferencial com redução de 100%. E o gene transportador de glicose-6-fosfato (G6Pt), apresenta-se reprimido em todos os tratamentos exceto para frutose.

Aos 12 meses, foram a Allotreonina, ácido glutâmico e Valina, que estão relacionados á glicólise e gluconeogênese. Os genes estudados: FBA, PFK, HXK e TPiso estão relacionados á glicólise, os genes TPISO e HXK apresentaram redução de expressão diante da Manose, e os genes PFK e FBA não apresentaram diferenças de expressão significativas.

Ao se remover a manose das análises, outros tratamentos puderam ser identificados como diferenciais, porém não apresentaram tamanha diferenciação quanto os que estavam sobre efeito da manose. Aos 4 meses identificou-se a B-Glucopiranose em resposta à Frutose, e aos 12 meses identificou-se o ácido hidrobenzóico em resposta à glicose, utilizando água como controle e ácido málico e fosfato inorgânico em resposta à sacarose; utilzando manitol como controle, que são metabólitos também relacionados á glicólise.

Em termos de expressão gênica, aos 4 meses, os genes responderam negativamente à sacarose em maior porcentagem, seguida da manose e dos demais açúcares. Aos 12 meses o percentual de genes diferencialmente expressos aumentou, sendo a manose o tratamento com maior percentual de genes diferencialmente expressos, seguido do 3-o-metilglicose que foi o açúcar com o maior percentual de expressão gênica positiva, seguido por sacarose, glicose e frutose que apresentaram o mesmo percentual de genes diferencialmente expressos Figura 62.

Tal ação sinalizadora diferencial da sacarose na expressão dos genes selecionados para o presente trabalho entre as idades talvez possa ser explicada pela relação fonte-dreno da cana-de-açúcar em desenvolvimento, visto que a folha da planta jovem comporta-se como dreno nos primeiros meses de idade, e a partir do décimo mês no qual a folha torna-se fonte de açúcares e os entrenós passam a ser o dreno essa função se inverte como descrito por CHAMBRA et al., 2011, sendo a atividade da sacarose diferencial entre as idades, com maior ação de sinalização quando a folha possui função de dreno na planta jovem. No entanto, em termos de metabolismo primário, observa-se uma alta ação da sacarose na reconfiguração do perfil metabólico primário obtido, (Figura 30), sendo que tais relações entre metabólitos, expressão gênica e sinalização de açúcares em cana-de-açúcar devem ainda, ser melhor elucidadas em trabalhos posteriores.

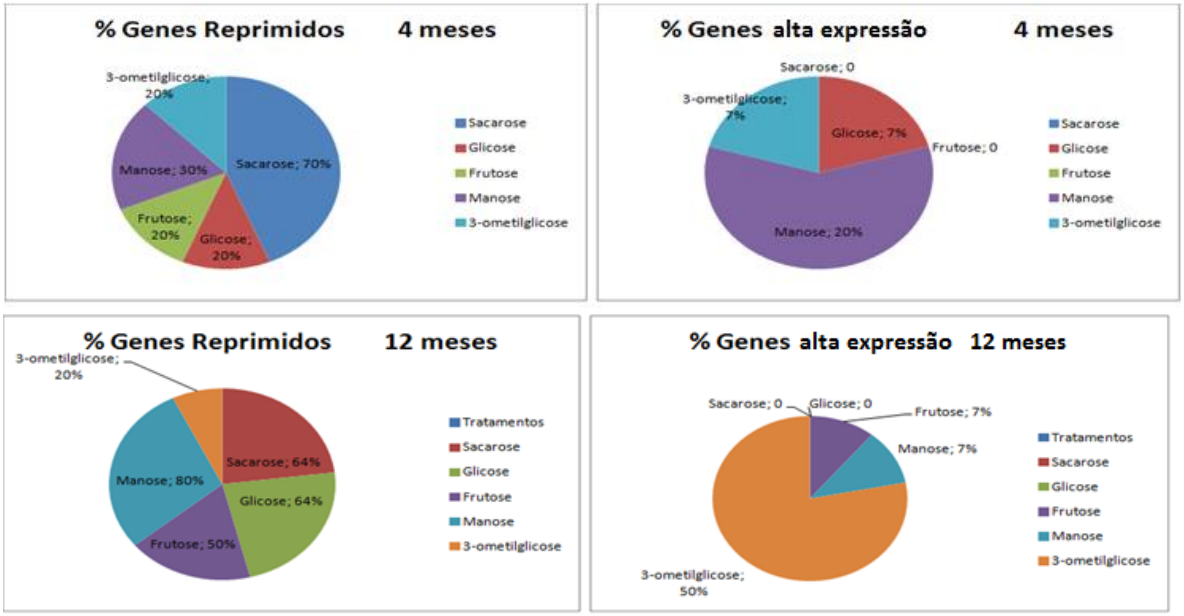


Figura 62 - Porcentagem de genes reprimidos e com alta expressão após o ensaio de sinalização de açúcares

Dentre os metabólitos essa relação de quantidade de metabólitos diferenciais ocorre como nos resultados de expressão gênica, em que se identificou uma quantidade maior de metabólitos diferenciais para a planta com 12 meses, em relação à quantidade de metabólitos diferenciais identificados para 4 meses. No entanto, a quantidade de aumentos de concentração dos metabólitos é maior para 12 meses do que aos 4 meses em que a maioria dos metabólitos apresentaram sua concentração reduzida, Figura 63.

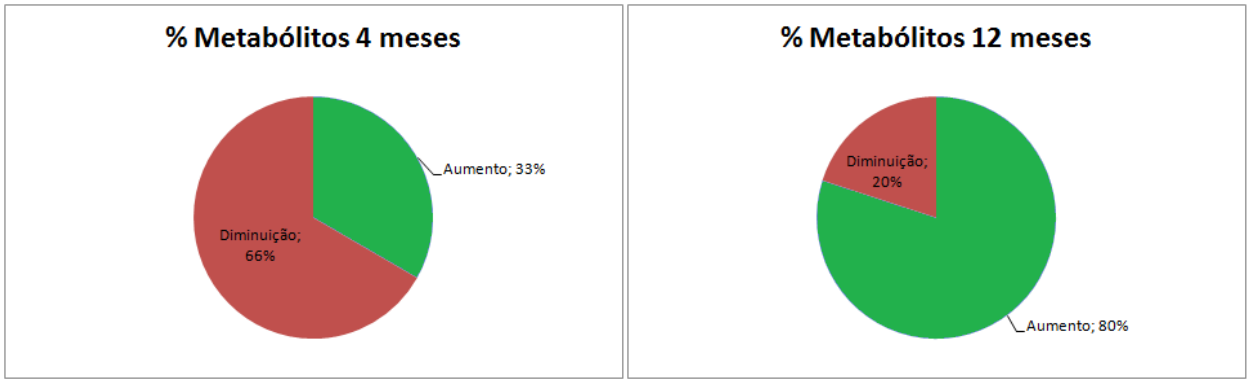


Figura 63 - Porcentagem de metabólitos diferenciais cuja abundância aumentou ou diminuiu após o ensaio de sinalização de açúcares

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste estudo foi possível identificar relações entre a sinalização de açúcares e seus homólogos, o desenvolvimento da cana-de-açúcar e as diversas vias em que estes podem atuar.

No que se refere ao desenvolvimento da planta, notou-se diferenças temporais na maneira pela qual os açúcares são reconhecidos, observa-se uma sensibilidade maior aos 12 meses, do que aos 4 meses, tanto para a ação dos açúcares quanto para o efeito osmótico, em que houveram maiores alterações no perfil de expressão gênica e na quantidade de metabólitos diferenciais. No entanto, as respostas de alterações de expressão e concentração de metabólitos aparentam ser opostas.

Em geral os tratamentos do ensaio de sinalização de açúcares chaves (sacarose, glicose e frutose) atuaram de forma negativa para os genes experimentais, exceto para a Sacarose Sintase em resposta à glicose aos 4 meses e Pirofosfatase Inorgânica em resposta à frutose aos 12 meses, o que indica que a concentração ótima de açúcar para uma sinalização positiva, deve ser posteriormente investigada.

Além disso, foi possível correlacionar os tipos de sinalização desencadeados entre as hexoses e sacarose (dissacarídeo) dentre os resultados de mudanças do perfil de expressão dos genes estudados.

O tratamento Manose apresentou alta ação na expressão gênica e nas alterações dos metabólitos, sendo o tratamento predominante nos resultados obtidos, o que confirma o seu papel de sequestrador de ortofosfato citoplasmático, que apresenta alto efeito no metabolismo do carbono em plantas quando aplicado exógenamente, como já descrito por HEROLD et al., 1976. Como foi confirmado através dos metabólitos diferenciais, dentre os quais, destacaram-se açúcares, como glicose 6-P, manose e frutose, galactose e aminoácidos participantes nas vias de glicólise e gluconeogênese.

O tratamento com 3-o-metilglicose indicou a sinalização direta dos tratamentos na expressão dos genes, e por ser considerado um açúcar não metabolizável apresentou altos níveis de sinalização positiva aos 12 meses ao contrário dos demais tratamentos aplicados que em geral apresentaram sinalização

negativa. E o fato de que se comprovou que a sinalização mediada por hexoquinases, pode variar com a idade da planta para um determinado gene.

No que se refere à hipótese explorada a respeito do tipo de sinalização desencadeado por hexoses no metabolismo da trealose, o qual já se foi afirmado ser independente de hexoquinases por EASTMONDO et al., 2003, no entanto refutado por ITURRIAGA et al., 2009, a partir dos ensaios realizados, observou-se que a Trealose Fosfato Sintase possui aos 4 meses sinalização de glicose e manose mediada por hexoquinases, sendo que aos 12 meses a sinalização por manose é independente de hexoquinases, uma condição de sinalização que se altera ao longo do desenvolvimento, e a Trealose-6-Fosfato Fosfatase apresenta sinalização mediada por hexoquinases constante. E o metabólito trealose foi caracterizado como diferencial ao longo do desenvolvimento da planta como já afirmado por (RAMON e ROLLAND, 2007; EVELAND e JACKSON, 2011). Além disso, apresentou constância nos testes de efeito osmótico o que pode reforçar a hipótese de sua ação na resistência hídrica/osmótica da cana-de-açúcar (ITURRIAGA et al., 2009 e SILVA et al., 2011). Sendo que o potencial da trealose como metabólito chave em cana de açúcar vem sendo explorado desde os trabalhos de BOSCH et al, 2003 e GLASSOP et al., 2007.

Aos 12 meses o metabolismo de síntese de sacarose é influenciado pelos três açúcares (sacarose, glicose e frutose) Figura 47. Relacionou-se as respostas de expressão gênica aos tratamentos de sinalização do gene SNF related Kinase com o metabolismo de trealose e síntese de sacarose (metabolismo de dissacarídeos), como já se havia proposto anteriormente pela literatura (Figuras 46 e 48).

Os resultados obtidos através da análise da sinalização desencadeada por sacarose podem indicar uma ação relacionada aos mecanismos de fonte-dreno ao longo do desenvolvimento da planta; em que a sacarose possui alta ação sinalizadora quando a folha apresenta papel de dreno, isto é nos primeiros meses de desenvolvimento, na planta adulta a folha torna-se fonte, e o dreno está localizado nos entrenós; e a sinalização da sacarose passa a não apresentar alto papel sinalizador.

Além do fato de que no perfil metabólico identificado, observa-se uma alteração completa do perfil de abundância dos metabólitos primários, entre 4 e 12 meses o que caracteriza essa alteração de papel da folha ao longo do desenvolvimento da planta de dreno para fonte.

Foi possível verificar através dos ensaios de metabolômica que os metabólitos primários mais afetados através do ensaio de sinalização foram os relacionados à via glicolítica o que pôde ser relacionado com os genes escolhidos para o projeto.

Por meio do presente projeto, buscou-se identificar e compreender pontos metabólicos chaves para o posterior melhoramento dirigido da cana-de-açúcar, buscando-se pela produção plantas comerciais, que possuam maior eficiência de produção para a indústria sucroalcooleira. Portanto, trabalhos posteriores devem buscar por mais informações a respeito das relações entre metabólitos, expressão gênica e sinalização de açúcares em cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

AHUATZI D.; RIERA A.; PELÁEZ R.; HERRERO P.; MORENO F. Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. **Journal Biology Chemistry**, Bethesda, v.282, p.4485-4493, 2007.

AITKEN K.S.;JACKSON P.A.;MCINTRYE C.L. Quantitative trait loci identified for sugar related traits in a sugarcane (Saccharum spp.) cultivar Saccharum officinarum population. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin,v. 112, p.1306-1317, 2006.

ALMS G.R.;SANZ P.;CARLSON M.;HAYSTEAD T.A. Reg1p targets protein phosphatase 1 to dephosphorylate hexokinase II in Saccharomyces cerevisiae: characterizing the effects of a phosphatase subunit on the yeast proteome. **EMBO Journal**, London,v.18, p. 4157-4168, 1999.

ANDERSEN C.L.; JENSEN J.L.; ORNTOFT T.F. Normalization of Real Time Quantitative Reverse Transcription PCR Data: A Model Based Variance Estimation Approach to identify Genes Suited for normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. **Cancer Research**, Baltimore, v.64, p. 5245-5250, 2004.

ATANASSOVA, R.; LETERRIER M.; GAILLARD C.; AGASSE A.;SAGOT E.; COUTOS-THÉVENOT P.; DELROT S. Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape, **Plant Physiology**, Washington, v.131, p. 326-334, 2003.

BAENA-GONZÁLEZ E.; ROLLAND F.;THEVELEIN J.M.; SHEEN J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. **Nature**. London, v.488, p. 938-943, 2007.

BAENA-GONZÁLEZ, E. Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. **Molecular Plant**, Saint Paul, v.3, n. 2, p. 300-313, 2010.

BANÁS, A.; KRZESZOWIEC, W.; DOBRUCKI, J.;GABRYŚ, H. Mannose, but not glucose or sucrose, disturbs actin cytoskeleton in Arabidopsis thaliana leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin / Heidelberg 0137-5881. 2010.

BINO R.J.; HALL R.D.;FIEHN O.; KOPKA J.; SAITO K.; DRAPER J.; NIKOLAU B.J.; MENDES, P.; ROESSNER-TUNALI,U.; BEALE, M.H.;, TRETHEWEY, R.N.; LANGE, B.M.; WURTELE, E.S.; SUMNER, L.W. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. **Trends in Plant Science,** Oxford, v.9,p.418–425, 2004.

BLÄSING O.E.;GIBON Y.;GÜNTHER M.;HÖHNE M.;MORCUENDE R.;OSUNA D.; THIMM O.;USADEL B.;SCHEIBLE W-R.;STITT M. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in Arabidopsis. **The Plant Cell,** Rockville**,** v.17, p.3257–3281, 2005.

BLÁZQUEZ, M.A.; SANTOS, E.; FLORES, C.; MARTÍNEZ ZAPATER, J.M.; SALINAS, J.; GANCEDO, C. Isolation and molecular characterization of the

Arabidopsis TPS1 gene, encoding trehalose- 6-phosphate synthase. **The Plant Journal,** Oxford, v.13, p. 685–689, 1998.

BOLOGA, K.L.; FERNIE, A.R.; LEISSE, A.; LOURIERO, M.E.; GEIGENBERGER, P. A bypass of sucrose synthase lead to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. **Plant Physiology**, Washington, v132, p. 2058–2072, 2003.

BOLOURI-MOGHADDAM, M.R.;LE ROY, K.; XIANG, L.; ROLLAND, F.;VAN DEN ENDE, W.Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. **The FEBS journal**, London, v. 277, n.9,p.2022-2037, 2010.

BOSCH S.; ROHWER J.M.; BOTHA F.C. The sugarcane metabolome. **Proceedings of South Africa Sugar Technology Association**, Johanesburg, v. 7, p. 129-133, 2003.

BOSCH, S. **Trehalose and carbon partioning in sugarcane.**. 2005. 211p. Tese (Doutorado em Filosofia) - Universidade de Stellenbosch, Africa do Sul, 2005.

BOTHA, F.C.;BLACK K.G. Sucrose phosphate synthase and sucrose synthase activity during maturation of internodal tissue in sugarcane. **Australian Journal of Plant Physiology,** Melbourne, **v.**27, p. 81–85, 2000.

BRANCO D.S. **Sinalização por carboidratos em cana de açúcar e divergência evolutiva**. 2008. 203p. Dissertação (Mestrado na área de Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

BÜTTNER, M.; SAUER, N. Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. **Biochimica et Biophysica Acta,** Amsterdan, v.1465, p. 263–272, 2000.

CALSA T.;FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (Saccharum spp.) leaves revealed alternative C4 metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology,** Ribeirão Preto, v.63, p. 745–762, 2007.

CARRARO D.M.;LAMBAIS, M.R.;CARRER, H. In silico Caracterization of sugarcane putative Sucrose Non-Fermenting 1 (SNF1) related kinase. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.24, n.1/4, p. 35-41, 2001.

CARSON, D.L.; BOTHA F.C. Preliminary analysis of expressed sequence tags of sugarcane. **Crop Science**, Madison,v. 40, p.1769-1779, 2000.

CARSON, D.L.; BOTHA,F.C. Genes expressed in sugarcane maturing intermodal tissue. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.20, p. 1075-1081, 2002.

CASU R.E.; GROF C.P.L.;RAE A.L.;MCINTYRE C.L.;DIMMOCK, C.M.; MANNERS,J.M. Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.52, p.371-386, 2003.

CASU R.E.;JARMEY J.J.; BONNET G.D.;MANNERS J.M. Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by

Affimetrix Gene Chip expression profiling. **Funct. Int. Genomics in press.** Oxford, 2007.

CASU, R.E.; DIMMOCK, C.M.; CHAPMAN, S.C.; GROF, C.P.L.; MCINTRYE,C.L.; BONNETT, G.D.;MANNERS J.M. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling**. Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, p. 503-517,2004.

CHAMBRA A.; JAIN R.; RAI, R.K.; SOLOMON, S. Revisiting the source-sink paradigm in sugarcane. **Current Science**, Columbus,v. 100, n. 7,p. 115-121, 2011.

CHEN, M.J.; THELEN, J.J. The plastid isoform of triose phosphate isomerase is required for post-germinative transition from heterotrophic to autotrophic growth in Arabidopsis. **Plant Cell**, Oxford, 10.1105/tpc.109.071837, 2010.

CHEN, S.; HAJIREZAEI, M.; BÖRNKE F. Differential expression of sucrose-phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. **Plant Physiology,** Washington, v.139, p.1163–1174, 2005.

CHENG, W.H.; IM,K.H.; CHOUREY, P.S. Sucrose-phosphate synthase expression at the cell and tissue level is coordinated with sucrose sink-to-source transition in maize leaf. **Plant Physiology**, Washington, v.111, p. 1021–1029, 1996.

CHENG, W-H.; ENDO, A.; ZHOU, L.; PENNEY,J.; CHEN, H-C.; ARROYO, A.; LEON P.; NAMBARA, E.; ASAMI, T.; SEO,M.; KOSHIBA, T.; SHEEN, J. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.14, p. 2723-2743, 2002.

CHIOU T.J**.;**BUSH D.R. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. **PNAS**, New York, v. 95,p.4784-4788, 1998.

CHO, J-I.; RYOO, N.; EOM, J.-S.; LEE, D.-W.;KIM, H.-B.; JEONG, S.-W.; LEE, Y.-H.Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. **Plant Physiology**, Washington, v.149, n.2, p.745-759, 2009.

CHO, Y.-E.; YOO, S.-D. E SHEEN J. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. **Cell** London, v.127, p.579-589, 2006.

CHO, Y.-H.; SHEEN, J.; YOO, S.-D. Low glucose uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from stress and defense hormone abscisic acid and C2H4 responses in Arabidopsis. **Plant Physiology,** Washington, v.152, n.3, p.1180-1182, 2010.

CHO, Y.-H.;YOO, S.-D.Signaling role of fructose mediated by FINS1/FBP in Arabidopsis thaliana. **PLoS Genetics**, San Francisco, v.7,n.1), e1001263, 2011.

CHOUREY, P.S.; TALIERCIO, E.W.;CARLSON, S.J,; RUAN,Y.L. Genetic evidence that the two isoenzymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. **Molecular and General Genetics,** New York, v.259,p.88–96, 1998.

CIERESZKO I.; JOHANSSON H.; KLECZKOWSKI L.A. Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in Arabidopsis. **Biochem Journal** Ottawa, v.354, p.67-72, 2001.

CONTENTO A.L.; KIM S.J.; BASSHAM D.C. Transcriptome profiling of the response of Arabidopsis suspension culture cells to sucrose starvation. **Plant Physiology,** Washington, v.135, p. 2330–2347, 2004.

CORTES S.; GROMOVA M.; EVRARD A. In plants, 3-Omethylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar, **Plant Physiology** Washington, v.131, p.824–837, 2003.

CROWE J.H.; HOEKSTRA F.A.; CROWE L.M. Anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology,** Palo Alto, v.54 p.579–599, 1992.

D'AOUST M.A.; YELLE S.; NGUYEN-QUOC B. Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. **The Plant Cell** , Oxford, v.11, p.2407–2418, 1996.

DAI, N.; KANDEL-KFIR M.; PETREIKOV.M.; HANAEL, R.; LEVIN, I. The tomato hexokinase LeHXK1 cloning, mapping, expression pattern and phylogenetic relationships**. Plant Science,** Limerick, v.163, p.581–590, 2002.

DAL´MOLIN, C.G.; QUEK L.-E.; PALFREYMAN R.W.; BRUMBLEY M.S. ; NIELSEN L.K. C4GEM, a Genome-Scale Metabolic Model to study C4 Plant Metabolism. **Plant Physiology,** Washington, v.154,p.1871-1885, 2010.

DANIAL, N.N.; GRAMM, C.F.; SCORRANO, L.; ZHANG, C.Y.; KRAUSS S.; RANGER, A.M.; DATTA,S.R.; GREENBERG, M.E.; LICKLIDER, L.J.; LOWELL,B.B.; GYGI, S.P. ; KORSMEYER, S.J. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. **Nature**, London, v.424,p.952-956, 2003.

DÉJARDIN A.; ROCHAT C.; WUILLÈM S.; DELMER D.; Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. **Plant, Cell and Environment,** Rockville, v.20, p.1421–1430, 1997.

DELATTE T. L.; SEDIJANI P.; KONDOU Y.; MATSUI M.; DE JONG G. J.; SOMSEN G. W.; WIESE-KLINKENBERG A.; et al.. Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. **Plant physiology**, Washington, v.157, n.1, p.160-174, 2011.

DENTIN R.; PÉGORIER J.P.; BENHAMED, F.; FOUFELLE,F.; FERRÉ P.; FAUVEAU, V.; MAGNUSON, M.A.; GIRARD,J.; POSTIC, C. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. **Journal Biology Chemistry,**Bethesda, v.279, p.20314-20326, 2004.

DÓCZI, R.; BRADER, G.; PETTKÓ-SZANDTNER, A.; RAJH, I.; DJAMEI,A.; PITZSCHKE, A.; TEIGE M.The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase

MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v.19, n.10, p.3266-3279, 2007.

EASTMOND, P.J.; VAN DIJKENS, A.J.H.; SPIELMAN, M.; KERR, A.; DICKINSON, H.; JONES, J.D.G.; SMEEKENS, S.; GRAHAM, I.A. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyzes the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation. **The Plant Journal**, Oxford, v.29, p.225–237, 2002.

EASTMOND, P.J.;GRAHAM, I.A. Trehalose metabolism: A regulatory role for trehalose-6-phosphate? **Current Opinion Plant Biology** Saint Louis, v.6,p.231–235, 2003.

ECHEVERRIA, E.; SALVUCCI,M.E.; GONZALEZ P.; PARIS G.; SALERNO G. Physical and kinetic evidence for an association between sucrose-phosphate synthase and sucrose-phosphate phosphatase. **Plant Physiology,** Washington, v.115,p. 223–227, 1997.

EVELAND, A. L.; JACKSON, D.P.Sugars, signalling, and plant development. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.1-11, 2011.

FELIX J. M. **Análise da expressão gênica envolvida no metabolismo de sacarose me cana-de-açúcar (Saccharum spp.).** 2006. 162p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) -Instituto de Biologia – Departamento de Genética e Evolução – Universidade de Campinas, Campinas,2006.

FELIX J. M.; PAPINI-TERZI F.S.; ROCHA F. R.; VÊNCIO R. Z. N.; VICENTINI R.; NISHIYAMA-JR. M. Y.; ULIAN E. C.; SOUZA G. M. e MENOSSI M. Expression profile of signal transduction components in a sugarcane population segregating for sugar content. **BMC Genomics,** London, v.10, p.120, 2009.

FERNIE A. R.; URBANCZYK-WOCHNIAK E.; WILLMITZER L. Parallel metabolite and transcript profiling – hypothesis generation for biotechnology. In: Vaidyanathan S., Harrigan G. G., Goodacre R. (eds) Metabolome Analyses: Strategies for Systems Biology. **Springer,** New York, p. 291–306, 2005.

FERNIE A.R.;STITT M. On the discordance of metabolomics with proteomics and transcriptomics: coping with increasing complexity in logic, chemistry and network interactions. **Plant Physiology,** Washington, In press, 2012.

FERNIE J.F.; WILLMITZER L.; TRETHEWEY R.N. Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. **Trends in Plant Science,** Oxford, v.7, p.35–41, 2002.

FIEHN O. Metabolomics- the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology,** Dordrecht, v.48, p.155-171, 2002.

FISCHER K.; WEBERA . Transport of carbon in non-green plastids. **Trends in Plant Science** Oxford, v.7, p.345–351, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), **Sugarcane potentials**, 2010.

FORNAZIER R. F.; AZEVEDO R. A.; FERREIRA R. R.; VARISI, V. A. Lysine catabolism: flow, metabolic role and regulation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v.15, n.1, p.9-18, 2003.

FRANCK N.; VAAST P.; GE´NARD M.; DAUZAT J. Soluble sugars mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown Coffea arabica. **Tree Physiology**, Oxford, v.26, p.517–525, 2006.

FREEZE H.H.; SHARMA V. Metabolic Manipulation of Glycosylation Disorders in Humans and Animal Models. **Seminariy Cell Developmet Biology** London, v 21, p.655-662, 2010.

FROMMER W.B.; SCHULZE W.X.; LALONDE S. Plant science. Hexokinase, Jackof-all-trades. **Science**, New York, v.300, p.261-263, 2003.

FU H.; KIM S-Y.; PARK A. potato Sus3 sucrose synthase gene contains a contextdependent 3' element and a leader intron with both positive and negative tissue-specific effects. **The Plant Cell,** Rockville, v.7,p.1395–1403, 1995.

GEIGENBERGER P.; REIMHOLZ R.; GEIGER M.; MERLO L.; CANALE V.; STITT M. Regulation of sucrose and starch synthesis in potato tubers in response to short-term water deficit. **Planta**, Berlin, v.201, p.502–518, 1997.

GEIGENBERGER P.; STITT M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant systems. **Planta**, Berlin, v.189, p.329–339, 1991.

GERMAN M.A.; DAI N.; MATSEVITZ T.; HANAEL R.; PETREIKOV M.; et al. Suppression of fructokinase encoded by LeFRK2 in tomato stem inhibits growth and causes wilting of young leaves. **Plant Journal,** Oxford, v.34, p.837–846, 2003.

GIBSON S.I. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v.8, p.93–102, 2005.

GIESE J.O.; HERBERS K.; HOFFMANN M.; KLÖSGEN R.B.; SONNEWALD, U. Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from Nicotiana tabacum**. FEBS Letters**. Amsterdan, v.579, p.827-831, 2005.

GLASSOP D.; ROESSNER U.; BACIC A.; BONNETT G. Changes in the sugarcane Metabolome with stem development. Are they related to sucrose accumulation? **Plant Cell Physiology** Oxford, v.48, n. 4, p.573-584, 2007.

GLASSOP D.; RYAN L.P.; BONNETT G.D.; RAE A.L. The Complement of soluble sugars in the Saccharum Complex. **Tropical Plant Biology**, Berkeley, v.3, p.110-122, 2010.

GODDIJN O.J.M.; SMEEKENS S. Sensing trehalose biosynthesis in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v.14, p.143–146, 1998.

GODDIJN O.J.M.; VERWOERD T.C.; VOOGD E.; KRUTWAGEN R.W.; DE GRAAF P.T.; VAN DUN K.; POELS J.; PONSTEIN A.S.; DAMM B.; PEN J. Inhibition of

trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. **Plant Physiology,** Washington, v.113, p.181–190, 1997.

GOLDEMBERG J.; E GARDABASSI P. The Potential of first generation ethanol production from sugarcane. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining** Chichester, v.4, p.17-24, 2009.

GROENEWALD J-H.; BOTHA F.C. Down regulating pyrophosphate-dependent phosphofructokinase (PFP) in sugarcane. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists,** Georgetown, **v.**24, p.592–594, 2001.

GROENEWALD J-H; BOTHA F.C. Down regulation of pyrophosphate: fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP) activity in sugarcane enhances sucrose accumulation in immature internodes. **Transgenic Research**, London, v.25, p. 657-661, 2007.

GROF C. P. L., CAMPBELL J. A. Sugarcane sucrose metabolism: scope for molecular manipulation. **Australian Plant Physiology**, Perth, v.28,p.1-12, 2001.

GULLBERG J.; JONSSON P.; NORDSTRÖM A.; SJÖSTRÖM M. MORITZ T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of Arabidopsis thaliana samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical biochemistry**, New York, v.331, n.2, p.283-295, 2004.

HAJIREZAEI M.; SONNEWALD U.; VIOLA R.; CARLISLE S.; DENNIS D.; STITT M.; Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers. **Planta**, Berlin, v.192, p.16–30, 1994.

HALFORD N. G.; PAUL M. J. Carbon metabolite sensing and signaling. **Plant Biotech Journal,** Oxford, v.1, p. 381–398, 2003.
HALFORD N.G.; HARDIE D.G. SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? **Plant Mol Biology**, Dordrecht, v.37,p.735-48,1998.

HALFORD N.G.; HEY, S.J. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. **The Biochemical journal**, London, v.419,n.2, p.247-259, 2009.

HALFORD N.G.; PURCELL P.C.; HARDIE D.G. Is hexokinase really a sugar sensor in plants? **Trends in Plant Science,** Oxford, v.4, p.117–120, 1999.

HALL R.; BEALE M.H.; FIEHN O.; HARDY N.; SUMNER N.; BINO R. (2002) Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies. **Plant Cell** Rockville, **v.**14, p.1437–1440, 2002.

HÄNGGI E.; FLEMING A.J. Sucrose synthase expression pattern in young maize leaves: implications for phloem transport. **Planta**, Berlin, v.214, p.326–329, 2001.

HANSON J.; HANSSEN M.; WIESE A.; HENDRIKS M.M.; SMEEKENS S. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by

regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. **Plant Journal**, Oxford, v.53, p.935-949, 2007.

HARRINGTON G.N.; BUSH D.R. The bifunctional role of hexokinase in metabolism and glucose signaling. **The Plant Cell,** Rockville, v.15, p.2493–2496, 2003.

HARRIS G. C.; GIBBS P. B.; LUDWIG G.; UN A.; SPRENGNETHER M.; KOLODNY N. Mannose metabolism in corn and its impact on leaf metabolites, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll fluorescence. **Plant Physiology**, Washington, v.82,n.4, p.1081-1089,1986.

HELDT H.W. Polysaccharides. New York: University Press, 1997. **Plant Biochemistry & Molecular** p.219–246.

HELLMAN H.; BARKER L.; FUNK D.; FROMMER F. The regulation of assimilate allocation and transport. **Australian Journal of Plant Physiology,** Melbourne, v.27, p.583–594, 2000.

HEROLD A.; LEEGOOD R.C.; MCNEIL P.H.; ROBINSON S.P. Accumulation of maltose during photosynthesis in protoplasts isolated from spinach leaves treated with mannose. **Plant Physiology,** Washington, v.67,p.85-88, 1981.

HEROLD A.; LEWIS D.H.; WALKER D.A. Sequestration of cytoplasmic orthophosphate by mannose and its differential effect on photosynthetic starch synthesis in C3 and C4 species. **New Phytology**, Cambridge, v.76, p.397-407, 1976.

HEROLD A.;. LEWIS D.H. Mannose and Green Plants : Occurrence , Physiology and Metabolism. **Metabolism Clinical And Experimental**, New York, v.1-p.40,1977.

HO L.C. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength**. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** Palo Alto, v.39, p.355–378, 1988.

HO S-L.; CHAO Y-C.; TONG W-F.; YU S-M. Sugar Coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms**. Plant Physiology,** Washington, v.125, p.877-890, 2001.

HOARAU J-Y.; OFFMANN B.; D´HONT A.; RISTERUCCI A-M.; ROQUES D.; GLASZMANN J-C.; GRIVET L. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (Saccharum spp.). I. Genome mapping with AFLP markers. **Theoretical Applied Genetics** Berlin, v.103, p.84-97, 2001.

HOEFGEN R.; NIKIFOROVA V. J. Metabolomics integrated with transcriptomics: assessing systems response to sulfur-deficiency stress. **Physiologia Plantarum,** Copenhagen**, v.**132, p.190-198, 2008.

HOEPFNER S. W.; BOTHA F. C. Purification and characterization of fructokinase from the culm of sugarcane. **Plant Science**, Limerick, v.167, p.645-654, 2004.

HONG S.P.; LEIPER F.C.; WOODS A.; CARLING D.; CARLSON M. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. **PNAS** Washington, v.00, p.8839-8843, 2003

HUANG J.W.; CHEN J.T.; YU W.P.; SHYUR L.G.; WANG A.Y.; SUNG H.Y.; LEE P.D.; SU J.C. Complete structures of three rice sucrose synthase isogenes and differential regulation of their expression. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** Tokyo, v.60, p.233–239, 1996.

HUANG J.W.; HUBER S.C. Phosphorylation of synthetic peptides by a CDPK and plant SNF1-related protein kinase. Influence of proline and basic amino acid residues at selected positions. **Plant and Cell Physiology,** Kyoto, v.42, p.1079–1087, 2001.

HUBER J.L.; HUBER S.C. Site-specific serine phosphorylation of spinach leaf sucrose- phosphate synthase. **Biochemical Journal,** London, v.283, p.877–882, 1992.

HUBER J.L.; ISREAL D.W. Biochemical basis for partitioning of photosynthetically fixed carbon between starch and sucrose in soybean (Glycine max Merr.) leaves. **Plant Physiology**, Washington, v.69, p.691–696, 1982.

HUBER S.C. Biochemical mechanism for regulation of sucrose accumulation in leaves during photosynthesis. **Plant Physiology,** Washington, v.91, p.656–662, 1989.

HUBER S.C.; HUBER J.L.; LAIO P.C.; GAGE D.A.; MCMICHAEL R.W.; CHOUREY P.S.; HANNA L.C.; KOCH K.E. Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase. **Plant Physiology,** Washington, v.112, p.793–802, 1996.

ISKANDAR H. M.; SIMPSON R. S.; CASU R. E.; BONNETT G. D.; MACLEAN D. J.;MANNERS J. M. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter,** Athens, v.22, p.325–337, 2004.

ISKANDAR H.M.; CASU R.E.; FLETCHER A.T.; SCHMIDT S.; XU J.; MACLEAN D.J.; MANNERS J.M.; BONNETT G.D. Identification of drought-responde genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms**. BMC Plant Biology**, London, v.11,p.12, 2011.

ITURRIAGA G.; SUÁREZ R.; NOVA-FRANCO B. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. **international journal of Molecular Sciences**, Basel, v.10, n. 9 ,p.3793-810, 2009.

JACKSON P. A. Breeding for improved sugar content in sugarcane. **Field Crops Research, Amsterdam,** v.92, p.277–290, 2005.

JANG J.C.; LEON P.; ZHOU L.; SHEEN J. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. **The Plant Cell**, London, v.9, p.5–19, 1997.

JANG J.C.; SHEEN J. Sugar sensing in higher plants. **The Plant Cell,** London, v.6, p.1665–1679, 1994.

JANG J.C.; SHEEN J. Sugar sensing in higher plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.2, p.208– 214, 1997.

JEANNEAU M.; VIDAL J.; GOUSSET-DUPONT A.; LEBOUTEILLER B.; HODES M.; GERENTES D.; PEREZ P. Manipulating PEPC levels in plants. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v.53, p.1837–1845, 2002.

JEFFERSON R.; GOLDSBROUGH A.; BEVAN M. Transcriptional regulation of a patatin-1 gene in potato. **Plant Molecular Biology** Dordrecht, v.14, p.995-1006,1990.

JOHNSTON M.; KIM J.H. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast Saccharomyces cerevisae. **Biochemistry Society Transcripts** Sheffield, v.33, p.247-252, 2005.

JONAK C.; KIEGERL S.; LIGTERINK W.; BARKER P.J.; HUSKISSON N.S.; HIRT H. Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, Washington, (USA) v.93, p.11274–11279, 1996.

JONES T.L.; ORT D.R. Circadian regulation of sucrose phosphate synthase activity in tomato by protein phosphorylation. **Plant Physiology**, Washington, v.113, p.1167–1175, 1997.

KARLEN Y.; MCNAIR A.; PERSEGUERS S.; MAZZA C.;; MERMOD N.Statistical significance of quantitative PCR. **BMC Bioinformatics**, London, v.8, p.131,2007

KATO-NOGUCHI H.; TAKAOKA T.; IZUMORI K. Psicose inhibits lettuce root growth via a hexokinase-independent pathway. **Physiologia Plantarum,** Copenhagen v.125, p.293–298, 2005.

KEGG (**Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**). (http://www.genome.jp/kegg/) 2010-2012.

KERR P.S.; HUBER S.C.; ISREAL D.W. Effect of N-source on soybean leaf sucrose phosphate synthase, starch formation, and whole plant growth. **Plant Physiology**, Washington, v.75, p.483– 488, 1984.

KERR P.S.; RUFTY T.W.; HUBER S.C. Endogenous rhythms in photosynthesis, sucrose phosphate synthase activity, and stomatal resistance in leaves of soybean (Glycine max [L.] Merr.). **Plant Physiology**, Washington, v.77, p.275–280, 1985.

KIM M.; LIM J.H.; AHN C.S.; PARK K.; KIM G.T.; KIM W.T.; PAI H.S. Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in Nicotiana benthamiana. **Plant Cell**, Rockville, v.18, p.2341-2355, 2006.

KING S.P.; LUNN J.E.; FURBANK R.T.; Carbohydrate content and enzyme metabolism in developing canola siliques. **Plant Physiology,** Washington, v.114, p.153–160, 1997.

KLEIN D.; STITT M. Effects of 2-deoxyglucose on the expression of RBCS and the metabolism of Chenopodium rubrum cell cultures. **Planta,** Berlin, **v.**205, p.223–234, 1998.

KOCH K. E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annual Review of Plant Biology,** Palo Alto, v.47, p.509–540, 1996.

KOCH K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current Opinnion in Plant Biology,** Saint Louis, v.7,p.235–246, 2004.

KOMATSU A.; TAKANOKURA Y.; MORIGUCHI T.; OMURA M.; AKIHIMA T. Differential expression of three sucrose-phosphate synthase isoforms during sucrose accumulation in citrus fruits. **Plant Science,** Limerick, v.140, p.169–178, 1999.

KOPKA J.; FERNIE A.; WECKWERTH W.; GIBON Y.; STITT M. Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations**. Genome Biology**, London, v.5, p.109, 2004.

KRAPP A, STITT W. An evaluation of direct and indirect mechanisms for the “sinkregulation” of photosynthesis in spinach: Changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. **Planta** v.195, p.313–323, 1995.

KROOK J.; VAN’T SLOT K.A.E.; VREUGDENHIL D.; DIJKEMA C.; VAN DER PLAS L.H.W. The triose-hexose phosphate cycle and the sucrose cycle in carrot (Daucus carota L.) cell suspensions are controlled by respiration and PPi:fructose-6-phosphate phosphotransferase. **Plant Physiology**, Washington,v.156, p.595–604, 2000.

KUNZ H. H.; HÄUSLER R. E.; FETTKE J.; HERBST K.; NIEWIADOMSKI P.; GIERTH M.; BELL K. et al., The role of plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocators in vegetative tissues of Arabidopsis thaliana mutants impaired in starch biosynthesis. **Plant Biology,** Stuttgart, v.12 Suppl 1, p.115-28, 2010.

LANGENKAMPER G.; FUNG R.W.M.; NEWCOMB R.D.; ATKINSON R.G.; GARDNER R.C.; MACRAE E.A. Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. **Journal of Molecular Evolution,** New York, v.54, p.322–332, 2002.

LEE J.W.; LEE D.S.; BHOO S.H.; JEON J.S.; LEE Y.H.; HAHN T.R. Transgenic Arabidopsis plants expressing Escherichia coli pyrophosphatase display both altered carbon partitioning in their source leaves and reduced photosynthetic rates. **Plant Cell Reports,** Berlin, v.24, p.374–382, 2005.

LEE S.; HIRT H.; LEE Y. Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in Glycine max. **The Plant Journal**, Oxford, v.26, p.479–486, 2001.

LEI M.; LIU D. Sucrose regulates plant responses to deficiencies in multiple nutrients, (august), **Plant Signaling & Behavior**, Oxford, v.10 p.1247-1249, 2011a.

LEI M.; LIU Y.; ZHANG B.; ZHAO Y.; WANG X.; ZHOU Y.; RAGHOTHAMA K. G. Genetic and genomic evidence that sucrose is a global regulator of plant responses to phosphate starvation in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Washington, v.156,n.3, p.1116-1130, 2011b.

LEMOINE R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. **Biochimica et Biophysica Acta,** Amsterdam, v.1465, p.246–262, 2000.

LEÓN P.; SHEEN J. Sugar and hormone connections. **Trends Plant Science,** Oxford, v.8, p.110-116, 2003.

LI C. Y.; SHI J. X.; WEISS D.; GOLDSCHMIDT E. Sugars regulate sucrose transporter gene expression in citrus. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** Orlando, v.306, p.402-407, 2003.

LI L.; LI Y.; ZHANG L.; XU C.; SU T.; REN D.; YANG H. Sucrose induces rapid activation of CfSAPK, a mitogen-activated protein kinase, in Cephalostachyum fuchsianum Gamble cells. **Plant, Cell & Environment**, Oxford In Press, 2012.

LINGLE S. E. Sugar metabolism during growth and development in sugarcane internodes. **Crop Science**, Madison, v.39, p.480-486,1999.

LORETI E.; ALPI A.; PERATA P. Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of alpha-amylase in barley embryos. **Plant Physiology**, Washington, v.123, p.939-948, 2000.

LORETI E.; DE BELLIS L.; ALPI A.; PERATA P. Why and How do Plants Cells Sense Sugars? **Annals of Botanny,** Oxford, v.88, p.803-812, 2001.

LOTHIER J.; LASSEUR B.; PRUD´HOMME M.P.; MORVAN-BERTRAND A. Hexokinase- dependent sugar signaling repress fructan exoxyhydrolase activity in Lolium perene. **Functional Plant Biology,** Victoria, v.37, p.1151-1160. 2010.

LUNN J.E. Sucrose-phosphatase gene families in plants. **Gene**, Amsterdan, v.303, p.187–196, 2003.

LUNN J.E.; AP REES T. Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose- phosphate synthase in seeds of Pisum sativum. **Biochemical Journal,** London, v.267, p.739–743, 1990.

LUNN J.E.; ASHTON A.R.; HATCH M.D.; HELDT H.W. Purification, molecular cloning, and sequence analysis of sucrose-6F-phosphate phosphohydrolase from plants. **Proceedings of the National Academy of Science** Washington, v.97,p.12914–12919, 2000.

LUNN J.E.; FURBANK R.T. Localisation of sucrose-phosphate synthase and starch in leaves of C4 plants. **Planta**, Berlin, v.202, p.106–111, 1997.

LUNN J.E.; MCRAE E. New complexities in the synthesis of sucrose. **Current Opinion in Plant Biology,** Oxford, v.6, p.208–214, 2003.

LUNN J.E; FURBANK R.T. Sucrose biosynthesis in C4 plants. **New Phytologist,** Cambridge,v.143,p. 221– 237, 1999.

LUNN JE.. Sucrose-phosphatase gene families in plants. **Gene,** Amsterdam, v.303, p.187–196, 2003.

MA J.; HANSSEN M.; LUNDGREN K.; HERNÁNDEZ L.; DELATTE, T.; EHLERT A.; LIU C.-M.; et al. The sucrose-regulated Arabidopsis transcription factor bZIP11

reprograms metabolism and regulates trehalose metabolism. **The New phytologist,** Lancaster, v.191(3), p.733-745, 2011.

MARTI´NEZ-BARAJAS E.; DELATTE T.; SCHLUEPMANN H.; DE JONG G.J.; SOMSEN G.W.; NUNES C.; PRIMAVESI L.F.; COELLO P.; MITCHELL R.A.C.; PAUL M.J. Wheat Grain Development Is Characterized by Remarkable Trehalose 6-Phosphate Accumulation Pregrain Filling: Tissue Distribution and Relationship to SNF1-Related Protein Kinase1 Activity 1 [W][OA]. **Plant physiology,** Washington, v.156, p.373-381, 2011.

MATIOLLI C. C.; TOMAZ, J. P.; DUARTE G. T.; PRADO F. M.; DEL BEM L. E. V.; SILVEIRA A. B.; GAUER L.; et al. The Arabidopsis bZIP gene AtbZIP63 is a sensitive integrator of transient ABA and glucose signals. **Plant physiology**, Washington, v.157, p.692-705, 2011.

MCCORMICK A. J. **Sink Regulation of Photossythesis in Sugarcane**. 2007, 268p. Tese (Doutorado em Filosofia) University of KwaZulu-Natal, Durban, South Africa, 2007.

MCCORMICK A. J.; CRAMER M. C.; WATT D. A. Changes in photosynthetic rates and gene expression of leaves during a source-sink perturbation in sugarcane. **Annals of Botany** London, v.101, p.89-102, 2008b.

MCCORMICK A. J.; CRAMER M. C.; WATT D. A. Regulation of photosynthesis by sugars in sugarcane leaves. **Journal of Plant Physiology,** Oxford, v.165, p.1817-1829, 2008c.

MCCORMICK A. J.; CRAMER M. C.; WATT D. A. Sink strength affects assimilate distribution and photosynthesis in sugarcane. **Proceedings South African Technology** , Johanesburg, v. 79 p. 514, 2008a.

MCCORMICK A. J.; CRAMER M. C.;WATT D. A. Differential expression of genes in the leaves of sugarcane in response to sugar accumulation. **Tropical Plant Bioloy**, Berkeley, v.1, p.142-158, 2008d.
MCCORMICK A. J.; WATT D. A.; CRAMER M. C Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.60, 2, p. 357-364, 2008e.

MCMICHAEL R.W.; KOCHANSKY J.; KLEIN R.R.; HUBER S.C. Characterization of the substrate specificity of sucrose-phosphate synthase protein kinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.321, p.71–75, 1995.

MING R.; DEL MONTE T. A.; HERNANDEZ E.; MOORE P. H.; IRVINE J. E.; PATERSON A. H. Comparative analysis of QTLs affecting plant height and flowering among closely-related diploid and polyploid genomes. **Genome**, Ottawa, v.45, p.794-803, 2002A.

MING R.; LIU S-C.; BOWERS J. E.; MOORE P. H.; IRVINE J. E.; PATERSON A. H. Construction of a Saccharum consensus genetic map from two interespecific crosses. **Crop Science**, Madison, v.42, p.570-583, 2002B.

MING R.; WANG Y-W.; DRAYE X.; MOORE P. H.; IRVINE J. E.; PATERSON A. H. Molecular dissection of complex traits in autopolyploids: mapping QTLs affecting sugar yield and related traits in sugarcane. **Theoretical Applied Genetics,**. Berlin, v.105, p.332-345 2002C.

MOORE B.; ZHOU L.; ROLLAND F.; HALL Q.; CHENG W-H.; LIU Y-X.; HWANG I.; JONES T.; SHEEN J. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light and hormonal signaling. **Science,** v.3000, p.332-336, Cambridge, 2003.

MOORE B.D.; SHEEN J. Plant sugar sensing and signaling: A complex reality. **Trends in Plant Science,** London, v.4, p.250, 1990.

MOORE P. H. Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: towards developing an understanding of the gene-to-crop continuum**. Field Crops Research,** Farnham Royal, v.92, p.119-135, 2005.

MOORE P. H. Temporal and spatial regulation of sucrose accumulation in the sugarcane stem. **Australian Journal Plant Physiology** Melbourne, v.22, p.661-679, 1995.

MORENO F.; AHUATZI D.; RIERA A.; PALOMINO C.A.; HERRERO P. Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. **Biochem Society Transcripts**, Cambridge, v.33, p.265-268, 2005.

MÜLLER J, AESCHBACHER RA, WINGLER A, BOLLER T, WIEMKEN A. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. **Plant Science,** Oxford v.112, p.1–9, 2001.

MÜLLER J.; AESCHBACHER R.A.; WINGLER A.; BOLLER T.; WIEMKEN A.; Trehalose and trehalase in plants: recent developments. **Plant Science,** Limerick, **v.**112, p.1–9, 2001.

NASSAU P. M.; MARTIN S. L.; BROWN R. E.; WESTON A. MONSEY D.; NASSAU P. A. M. M.; MARTIN S. L.; et al. Galactofuranose biosynthesis in Escherichia coli K-12 : identification and cloning of UDP-galactopyranose mutase . Galactofuranose Biosynthesis in Escherichia coli K-12 : Identification and Cloning of UDP-Galactopyranose Mutase. **Microbiology**, Paris, v 178,n.4, p.1047, 1996.

NELSON D.L.;COX M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. USA: Worth Publishers, 2005.

NGUYEN-QUOC B.; FOYER C.H. A role for “futile cycles” involving invertase and sucrose synthase metabolism of tomato fruit. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v.52, p.881–889, 2001.

NIELSEN T.H.; STITT M. Tobacco transformants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate expression in the base of their young growing leaves contain much higher levels of fructose-2,6-bisphosphate but no major change in fluxes. **Planta**, Berlin v.214, p.106–116, 2001.

NOLTE K.D.; KOCH K.E. Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. A role for “futile cycles” involving invertase and sucrose synthase metabolism of tomato fruit. **Plant Physiology,** Washington, v.101, p.899–905, 1993.

ODANAKA S.; BENNETT A.B.; KANAYAMA Y. Distinct physiological roles of fructokinase isozymes revealed by gene-specific suppression of Frk1 and Frk2 expression in tomato. **Plant Physiology**, Washington, v.129, p.1119–1126, 2002.

OSUNA D.; USADEL B.; MORCUENDE R.; GIBON Y.; BLÄSING O. E.; HÖHNE M.; GÜNTER M.; KAMLAGE B.; TRETHEWEY R.; SCHEIBLE W-R.; STITT M. Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived Arabidopsis seedlings. **Plant Journal,** Oxford, v.49, p.463–491, 2007.

PAN,Z.; RAFTERY, D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. **Analytical Bioanalytic Chemistry**, Heidelberg, v.387, p.525-527, 2007.

PAPINI-TERZI F. S.; FELIX J. M.; ROCHA F. R.; WACLAWOVSKY A. J.; ULIAN E. C.; CHABREGAS S. M.; FALCO M. C.; NISHIYAMA-JR. M. Y.; VÊNCIO R. Z. N.; VICENTINI R.; MENOSSI M.; SOUZA G. M. The SUCEST-FUN project: identifying genes that regulate sucrose content in sugarcane plants. **ISSCT.** Georgetown,lv. 26, 2007.

PAUL M. J.; FOYER C. H. Sink regulation of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 52, p.1383–1400, 2001.

PAUL M. J.; PELLNY T. K. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.54,p.539–547, 2003.

PAUL M. J.; PRIMAVESI L.F.; JHURREA D.; ZHANG Y. Trehalose Metabolism and Signaling. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v.59, p.417-41, 2008.

PAUL M.J,; FOYER C.H. Sink regulation of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany,** London, **v.**52, p.1383–1400, 2001.

PAUL M.J.; JHURREEA D.; ZHANG Y.; PRIMAVESI L.F.; DELATTE T.; SCHLUEPMANN H.; WINGLER A. Upregulation of biosynthetic processes associated with growth by trehalose 6-phosphate. **Plant Signal Behav,** Oxford, v.5, p.386–392, 2010.

PAUL MJ, FOYER CH. Sink regulation of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany,** Limerick, *v.* 52, p.1383–1400, 2001.

PAUL MJ. Trehalose 6-phosphate**. Current Opinion in Plant Biology,** London, v.10, p.303–309, 2007.

PEGO J. V.; WEISBEEK P. J.; SMEEKENS S. C. M. Mannose Inhibits Arabidopsis Germination via a hexokinase step. **Society,** Champaign, v.119 , p.1017-1023, 1999.

PEGO J.V.; SMEEKENS S. Plant fructokinases: A sweet family get together. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.5, p.531–536, 2000.

PÉREZ-CASTIÑEIRA J.R.; HERNÁNDEZ A.; DRAKE R.; SERRANO A. A plant proton-pumping inorganic pyrophosphatase functionally complements the vacuolar ATPase transport activity and confers bafilomycin resistance in yeast. **Biochemistry Journal**, Otawa,v.437, n.2, p. 269-278, 2011.

PFAFFL M. W.; HORGAN G. W.; DEMPLFE L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30,p. 9, 2002.

POLGE C.; THOMAS M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? **Trends Plant Science,**Oxford**,** v.12, p.20-28 , 2007.

PRICE J.; LAXMI A.; S.T.; MARTIN S. K.; JANG J-C. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v.16, p.2128–2150, 2004.

PURCELL P.C.; SMITH A.M.; HALFORD N.G. Antisense expression of a sucrose nonfermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. **Plant Physiology,** Washington, v.114, p.307-314 1998.

RAE A. L.; GROF C. P. L.; CASU R. E.; BONNETT G. D. Sucrose accumulation in the sugarcane stem: pathways and control points for transport and compartimentation**. Field Crop Research**, Farnham Royal, v.92, p.159-168, 2005.

RAMAKERS C.; RUIJTER J. M.; LEKANE-DEPREZ R. H.; MOORMAN A. F. M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**,Limerick, v.339, p.62–66, 2003.

RAMON M.;ROLLAND F. Plant development: introducing trehalose metabolism. **Trends in plant science**, Oxford, v.12, n.5, p.185-188, 2007.

RAMON, M.; ROLLAND, F.; SHEEN, J. Sugar Sensing and Signaling. **The Arabidopsis Book,** v.67, n. 1, p.1., 2008.

RICARD B.; VAN TOAI T.; CHOUREY P.; SAGLI O. Evidence for the critical role of sucrose synthase for anoxic tolerance of maize roots using a double mutant. **Plant Physiology,** Washington, v.116, p.1323–133,1998.

RODRIGUES D.J. **Fisiologia de Cana-de-açúcar**. Apostila. Universidade Estadual Paulista- Instituto de Biosciências- Câmpus de Botucatu- Botucatu, 1995.

ROHWER J. M.; BOTHA F. C. Analysis of sucrose accumulation in the sugar cane culm on the basis of in vitro kinetic data**. Biochemistry Journal** Ottawa, v.358, p.437-445, 2001.

ROLLAND F.; BAENA-GONZALEZ E.; SHEEN J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review Plant Biology** Palo Alto, v.57, p.675-709, 2006.

ROLLAND F.; MOORE B.; SHEEN J. Sugar sensing and signaling in plants. **The Plant Cell,** Rockville, v.14 (Suppl.), p.185–205, 2002.

ROOK F.; GERRITS N.; KORTSTEE A.; VAN KAMPEN M.; BORRIAS M.; WEISBEEK P.; SMEEKENS S. Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. **Plant Journal,** Oxford,v.5, p. 253–263, 1998.

ROOK F.; HADINGHAM A. S.; LI Y.; BEVAN M. W. Sugar and ABA response pathways and the control f gene expression. **Plant Cell Envir**, Oxford v.29, p.426-434, 2006.

RUAN Y.L.; LLEWELLYN D.J.; FURBANK R.T. Suppression of sucrose synthase gene expression respresses cotton fiber initiation, elongation and seed development. **The Plant Cell,** Rockville, v.15, p.952–964, 2003.

RUTLEDGE A.C.; ADELI K. Fructose and the metabolic syndrome: Pathophysiology and molecular mechanisms. **Nutrition Reviews,** New York. v.65, p.S13–S23, 2007.

RYLOTT E. L.; GILDAY A. D.; GRAHAM I. A. The gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in Arabidopsis is essential for seedling establishment. **Plant Physiology,** Minneapolis, v.131, p.1834–1842, 2003.

SAITO K.; KASE T.; TAKAHASHI E.; HORINOUCHI S. Purification and characterization of a trehalose synthase from the basidiomycete Grifola frondosa. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v.64, p.4340–4345, 1998.

SAMBROOK J.; FRITSCH E.F.; MANIATIS T. (Ed.) **Molecular cloning: a laboratory manual,** 2nd ed. Cold Spring Harbor :Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.p.8.46.

SANTANGELO, G. M., Glucose Signaling in Saccharomyces cerevisiae. **Society,** Doncaster,v.70, n.1,p.253-82 2006.

SARMA N.J.; HALEY T.M.; BARBARA K.E.; BUFORD T.D.; WILLIS K.A.; SANTANGELO G.M.. Glucose-responsive regulators of gene expression in Saccharomyces cerevisiae function at the nuclear periphery via a reverse recruitment mechanism. **Genetics.** Pittsburgh,v.175, p.1127-35, 2007.

SAWADA Y.; AKIYAMA K.; SAKATA A.; KUWAHARA A.; OTSUKI H.; SAKURAI T.; SAITO K.; HIRAI M.Y. Widely targeted metabolomics based on large-scale MS/MS

data for elucidating metabolite accumulation patterns in plants. **Plant Cell Physiology,** Oxford, v.50, n.1, p.37-47, 2008.

SCHÄFER W.E.; ROHWER J.M.; BOTHA F.C. A kinetic study of sugarcane sucrose synthase. **European Journal of Biochemistry,** London, v.271, p.3971–3977, 2004.

SCHAUER N.; FERNIE A. R. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. **Trends Plant Science,** Yokohama, v.11,p.508–516, 2006.

SCHAUER N.; STEINHAUSER D.; STRELKOV S.; SCHOMBURG D.; ALLISON G.; MORITZ T.; LUNDGREN K.; et al. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS letters**, Amsterdan, v.579, n. 6, p.1332-1337, 2005.

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 Science,** Washington**,** v.100, p.6849–6854, 2003.

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

SHEEN J. Metabolic repression of transcription in higher plants. **The Plant Cell,** London, v.2, p.1027– 1038, 1990.

SHEEN J.; ZHOU L.; JANG J-C. Sugars as signaling molecules. **Current Opinnion in Plant Biology,** Saint Louis, v.2, p.410–418, 1999.

SIECIECHOWICZ K.A.; JOY K.W.; IRELAND R.J. The metabolism of asparagine in plants. **Phytochemistry,** New York,. v.27, p.663-671, 1998.

SILVA R.L.O.; FERREIRA NETO J.R.C.; PANDOLFI V.; CHABREGAS S.M.; BURNQUIST W.L.; BENKO-ISEPPON A.M.; KIDO E.A. Transcriptomics of Sugarcane Osmoprotectants Under Drought. **Plants and Enviroment**. Chap. 4. In Tech. Rijeka, 2011. 284p.

SILVIUS J.E.; CHATTERTON N.J.; KREMER D.F. Photosynthate partitioning in soybean leaves at two irradiance levels. Comparative responses of acclimated and unacclimated leaves. **Plant Physiology,** Washington, v.64, p.872–875, 1979.

SMEEKENS S. Sugar-Induced signal transduction in plants**. Plant Molecular Biology**, Athens, v.51, p.49–81, 2000.

SMITH, A.M.; STITT, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant Cell Environ**, Malden, v.30, p.1126-1149, 2007.

SOUZA A.P. **Mecanismos fotossintéticos e relação fonte-dreno em cana-de-açúcar cultivada em atmosfera rica em CO_2**. 2011, 228p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biosciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SOUZA G. M.; SIMÕES A. C. Q.; OLIVEIRA K. C.; GARAY H. M.; FIORINI L. C.; GOMES F. S.; NISHIYAMA M. Y.; SILVA A. M. The sugarcane signal transduction (SUCAST) catalogue: prospecting signal transduction in sugarcane. **Genetic Molecular Biology ,** Ribeirão Preto, v.24, p.25-34, 2001.

STEINHAUSER D.; KOPKA J. Methods, applications and concepts of metabolite profiling: primary metabolism. In: BAGINSKY, S.; FERNIE, A.R.(Ed.) **Plant Systems Biology**. Birkhaüser, Heidelberg, 2007. p.171–194.

STITT M. Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** Palo Alto, v.41, p.153–185, 1990.

STITT M. Nitrate regulation of metabolism and growth. **Current Opinion in Plant Biology,** London, v.2, p.178–186, 1999.

STITT M.; GIBON Y.; LUNN J. E.; PIQUES M. Multilevel genomics analysis of carbon signaling availability: coordinating the supply and utilization of carbon in a fluctuating environment**. Functional Plant Biology,** Victoria, v.34, p.526-549, 2007.

STITT M.; HUBER S.C.; KERR P.S. Control of photosynthetic sucrose formation. In: HATCH,M.D.; BOARDMAN, N.K. (Ed.). **The Biochemistry of Plants.**, New York: Academic Press, 1987. p.208–214.

STITT M.; KRAPP A. The molecular physiological basis for the interaction between elevated carbon dioxide and nutrients. **Plant, Cell & Environment,** Malden; v.22, p.583–622, 1999.

STITT M.; MIESKES G.; SÖLING H-D.; HELDT HW. On a possible role of fructose 2,6- bisphosphate in regulating photosynthetic metabolism in leaves. **FEBS Letters,** London, v.145, p.217– 222, 1982.

STITT M.; SCHULZE E-D. Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? **Plant, Cell and Environment** , London, v.17, p.465–487, 1994.

STITT M.; SONNEWALD U. Regulation of metabolism in transgenic plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** London, v.46, p.341–368, 1995.

STOOP M.H.; JOHN D.; WILLIAMSON D.; MASON PHARR. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress, **Trends in Plant Science**, Oxford, v.1, p.139-144, 1996.

STULKE J.;HILLEN W. Carbon catabolite repression in bacteria. **Current Opinion in Microbiology.** Paris v.2, p.195-201, 1999.

STURM A., TANG G-Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. **Plant Physiology,** Washington, v.121, p.599–608, 1999.

SUGIHARTO B.; SAKAKIBARA H.; SUMADI-SUGIYAMA T. Differential expression of two genes for sucrose-phosphate synthase in sugarcane: molecular cloning of the cDNAs and comparative analysis of gene expression. **Plant Cell Physiology,** Oxford, v.38, p.961–965, 1997.

SUZUKI J.; MUTTON M.A.; FERRO M.I.T.; LEMOS M.V.F.; PIZAURO J,M.; MUTTON M.J.R.; MARUO S.M.Z. Putative pyrophosphate phosphofructose 1-kinase genes identified in sugar cane may be getting energy from pyrophosphosphate. **Genetics and Molecular Research,** Ribeirão Preto, v.4, p.376–382, 2003.

THIMM O.; BLÄSING O.; GIBON Y.; NAGEL A.; MEYER S.; KRÜGER P.; SELBIG J.; MÜLLER L. A.; RHEE S. Y.; STITT M. MapMan, a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. **The Plant Journal,** Oxford, v.37, p.914–939, 2004.

THUM K. E.; SHIN M. J.; PALENCHAR P. M.; KOURANOV A.; CORUZZI G. M. Genome wide investigation of light- and C-signalling interactions in Arabidopsis. **Genome Biology,** London, v.5,n. 5, p.10, 2004.

TIESSEN A.; PRESCHA K.; BRANSCHEID A.; PALACIOS N.; MCKIBBIN R.; HALFORD N.G.; GEIGENBERGER P. Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. **Plant Journal**, Oxford. v.35, p.490-500, 2003.

TOROSER D.; ATHWAL G.S.; HUBER S.C. Site-specific regulatory interaction between spinach leaf sucrose-phosphate synthase and 14-3-3 proteins. **FEBS Letters**, London, v.435, p.110–114, 1998.

TRAVIS A.J.; SUI D.; RIEDEL K.D.; HOFMANN N.R.; MOSS S.B.; WILSON J.E.; KOPF G.S. A novel NH(2)-terminal, nonhydrophobic motif targets a male germ cellspecific hexokinase to the endoplasmic reticulum and plasma membrane. **Journal Biology Chemistry,** Rockville, v.274, p.34467-34475,1999.

TURNER W.;BOTHA F. C. (2002) Purification and kinetic properties of UDP-glucose dehydrogenase from sugarcane. **Archives Biochemistry Biophysics**. San Antonio, v.407, p.209-216, 2002.

UEMATSU K., SUZUKI N., IWAMAE T., INUI M., AND YUKAWA H. Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants **Journal of Experimental Botanic Oxford**, In Press,2012.

VAN DER MERWE M. J. **Influence of hexose-phosphates and carbon cycling on sucrose accumulation in Sugarcane spp**. 2005, 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de Stellenbosch, Stellenbosh, Africa do Sul, 2005.

VAN DONGEN J.T.; SCHURR U.; PFISTER M.; GEIGENBERGER P. Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. **Plant Physiology**, Washington, v.131, p.1529–1543, 2003.

VÊNCIO R. Z. N.; KOIDE T. HTself: self-self based statistical test for low replication microarray studies. **DNA research:** an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes**,** Oxford, v.12, n. 3, p.211-214, 2005.

VERMA A.K.; UPADHYAY S.K.; VERMA P.C.; SOLOMON S.; SINGH S.B. Functional analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose sintase (SS) in sugarcane (Saccharum) cultivars. **Plant Biology**, Berlin, v.13, p.325-332, 2010.

VETTORE AL. et al. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.13, p.2725-2735, 2003.

VOGEL G.; AESCHBACHER R.A.; MULLER J.; BOLLER T.; WIEMKEN A. Trehalose-6- phosphate phosphatases from Arabidopsis thaliana: complementation of the tps2 mutant. **The Plant Journal,** Oxford v.13, p.673–683, 1998.

VOGEL G.; FIEHN O.; JEAN-RHICHARD-DIT-BRESSEL L.; 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,** London, v.414, p.1817–1826, 2001.

WÄCHTER R.; LANGHANS M.; ALONI R.; GÖTZ S.; WEILMÜNSTER A.; KOOPS A.; TEMGUIA L.; MISTRIK I.; PAVLOVKIN J.; RASCHER U.; SCHWALM K,; KOCH K.E.; ULRICH C.I. Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by Agrobacterium tumefaciens. **Plant Physiology,** Washington, v.133, p.1024–1037, 2003.

WANG Y.M.; VAN EYS J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols**.** **Annual Review Nutrition**; Palo Alto, v.1, p.437-75, 1981.

WARD J.L.; BAKER J.M.; BEALE M.H. Recent applications of NMR spetroscopy in plant Metabolomics. **FEBS Journal**, Oxford, v.274, p.1126-1131, 2007.

WEI Y.; WANG D.; TOPCZEWSKI F.; PAGLIASSOTTI M.J. Fructose-mediated stress signaling in the liver: implications for hepatic insulin resistance. **Journal Nutritional Biochemistry.** Rockville, **v.**18,p.1–9, 2007.

WENZLER H.; MIGNERY G.; FISHER L.; PARK W. Sucrose-regulated expression of a chimeric potato tuber gene in leaves of transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, Athens,v.13, p.347-354, 1989.

WHITTAKER A.; BOTHA F.C. Carbon partitioning during sucrose accumulation in sugarcane internodal tissue. **Plant Physiology.** Washington, v.115, p.1651–1659,1997.

WIESE A.; ELZINGA N.; WOBBES B.; SMEEKENS S. A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. **Plant Cell**. Rockville, v.16, p.1717- 1729 2004.

WILLIAMS L.E.; LEMOINE R.; SAUER N. Sugar transporters in higher plants – diversity of roles and complex regulation. **Trends In Plant Science,** London, v.5, p.283–290, 2000.

WILSON J.E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. **Journal Experimental Biology,** Cambridge, v.206, p.2049-2057, 2003.

WIND, J., SMEEKENS, S., HANSON, J. Sucrose: metabolite and signaling molecule. **Phytochemistry,** New York, v.71, p.14-15, 2010.

WINGLER A.; FRITZIUS T.; WIEMKEN A.; BOLLER T.; AESCHBACHER R.A. Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, ApL3, and starch synthesis in Arabidopsis. **Plant Physiology,** Washington, v.124, p.105–114, 2000.

WINGLER, A. The function of trehalose biosynthesis in plants. **Phytochemistry,** New York, v.60, p.437– 440, 2002.

WINTER H.; HUBER J.L.; HUBER S.C.. Membrane association of sucrose synthase: changes during the graviresponse and possible control by protein phosphorylation. **FEBS Letters**, London, v.420, p.151–155, 1997.

WINTER H.; HUBER J.L.; HUBER S.C.; Identification of sucrose synthase as an actin binding protein. **FEBS Letters,** London, v.430, p.205–208, 1998.

WINTER H.; HUBER S.C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localisation and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Plant Sciences,** London, v.19, p.31–67, 2000.

WOBUS U.; WEBER H. Sugars as signal molecules in plant seed development. **Journal of Biological Chemistry,** Bethesda, v.390, p.937–944, 1999.

WORRELL A.C.; BRUNEAU J.M.; SUMMERFELT K.; BOERSIG M.; VOELKER TA. Expression of maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. **Plant Cell**, Oxford, v.3, p.1121–1130, 1991.

WU L.; BIRCH R.G. Physiological basis for enhanced sucrose accumulation in an engineered sugarcane cell line. **Functional Plant Biology,** Victoria, v.37, p.1161-1174, 2010.

XIAO W.; SHEEN J.; JANG J-C. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development**. Plant Molecular Biology,** Athens, v.44, p.451–461, 2000.

YANAGISAWA S.; YOO S.D.; SHEEN J. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signaling in plants. **Nature.** London. v.25, p.521-525 2003.

ZENG Y.; WU Y.; AVIGNE W.T.; KOCH K.E. Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranslational responses. **Plant Physiology,** Washington, **v.**116,p.1573–1583, 1998.

ZENG Y.; YANG T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.20, p.417a-417e, 2002 .

ZHANG S, KLESSIG DF. MAPK cascades in plant defense signaling. **Trends in Plant Science,** Oxford, v.6, p.520–527, 2002.

ZHANG S.Z.; YANG B.P.; FENG C.L.; CHEN R.K.; LUO J.P.; CAI W.W.; LIU .FH. Expression of the Grifola frondosa trehalose synthase gene and improvement of drought-tolerance in sugarcane (Saccharum officinarum L.). **Journal of Integrative Plant Biology,** Malden, **v.**48, p.453–459, 2006.

ZHANG S.Z.; YANG B.P.; FENG C.L.; TANG H.L. Genetic transformation of tobacco with trehalose synthase gene from Grifola frondosa enhances the resistance to drought and salt in tobacco. **Journal of Integrative Plant Biology,** Malden, v.47, p.579–587, 2005.

ZHANG S.Z.; ZHENG X.Q. Cloning and sequencing of the gene encoding trehalose synthase. **Chinese Journal of Tropical Crops,** Pequin, v.5, p.21–25, 1999.

ZHANG Y.; PRIMAVESI L.F.; JHURREEA D.; ANDRALOJC P.J.; MITCHELL R.A.; POWERS S.J.; SCHLUEPMANN H.; DELATTE T.; WINGLER A.; PAUL M.J. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. **Plant Physiology,** Washington, v.149, p.1860–1871, 2009.

ZHENG Z.; XU X.; CROSLEY R. A.; GREENWALT S. A.; SUN Y.; BLAKESLEE B.; WANG L.; et al. (2010). The protein kinase SnRK2.6 mediates the regulation of sucrose metabolism and plant growth in Arabidopsis. **Plant Physiology,** Washington, v.153,n.1, p.99-113, 2010.

ZHOU L.; JANG J.C.; JONES T.L.; SHEEN J. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA,** Washington, v.95, p.10294-10299, 1998.

ZRENNER R,; KRAUSE K.P.; APEL P.; SONNEWALD U. Reduction of the cytosolic fructose 1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants limits photosynthetic sucrose biosynthesis with no impact on plant growth and tuber yield. **Plant Journal**, London, v.9, p.671–681, 1996.

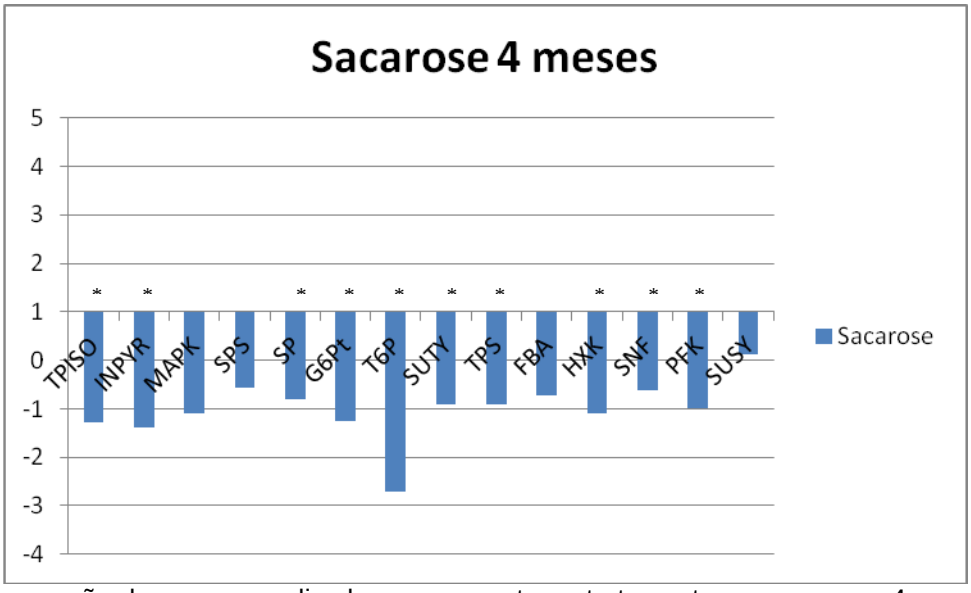
ZRENNER R.; SALANBOUT M.; WILLMITZER L.; SONNEWALD U. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (Solanum tuberosum L.) **Plant Journal**, London, v.7, p.97–107, 1995.

ANEXOS

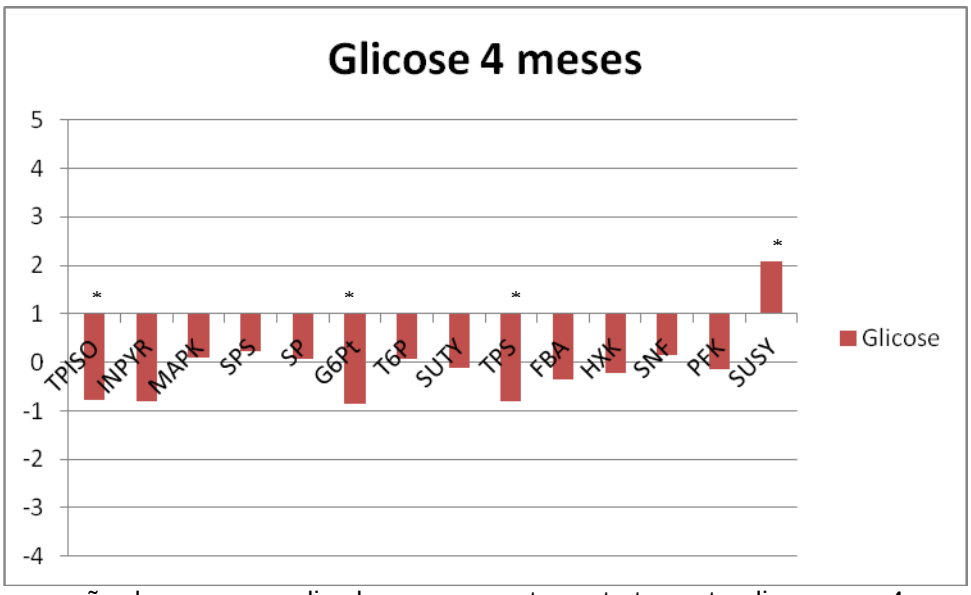
ANEXO A

Quantificação da expressão relativa dos genes *versus* tratamentos: controle experimental manitol

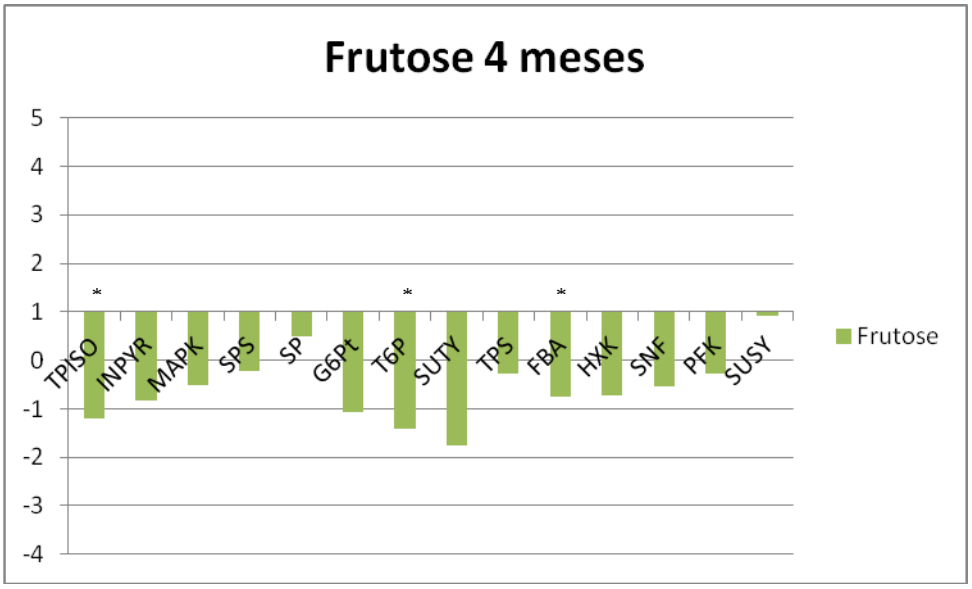
Perfil de Expressão aos 4 meses



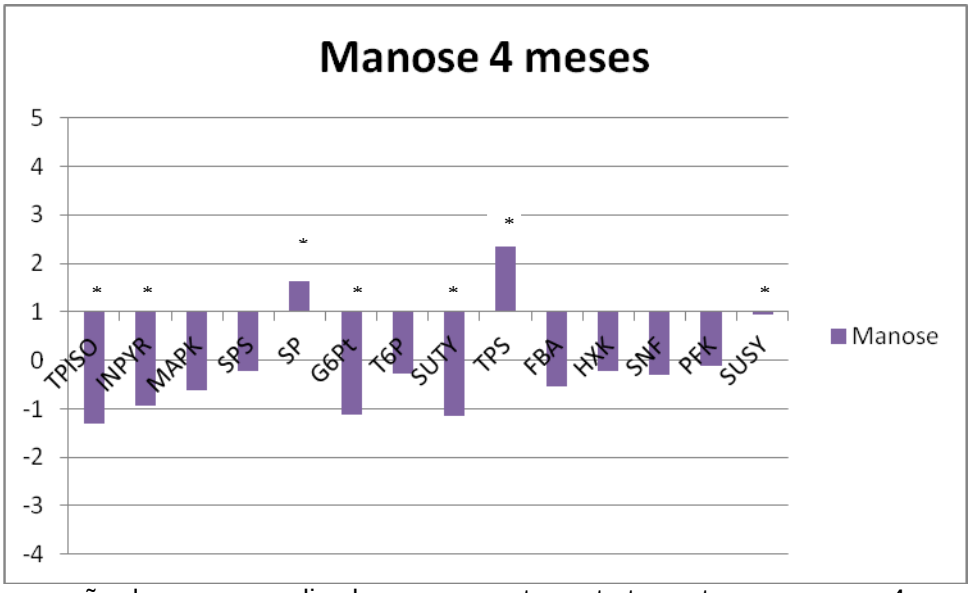
Perfil de expressão dos genes analisados em resposta ao tratamento sacarose aos 4 meses. REST: teste de hipótese e intervalo de confiança à 95%. Eixo vertical: Valores de Expressão Gênica em Escala Linear, Eixo horizontal: Genes experimentais. *Estatisticamente significativos



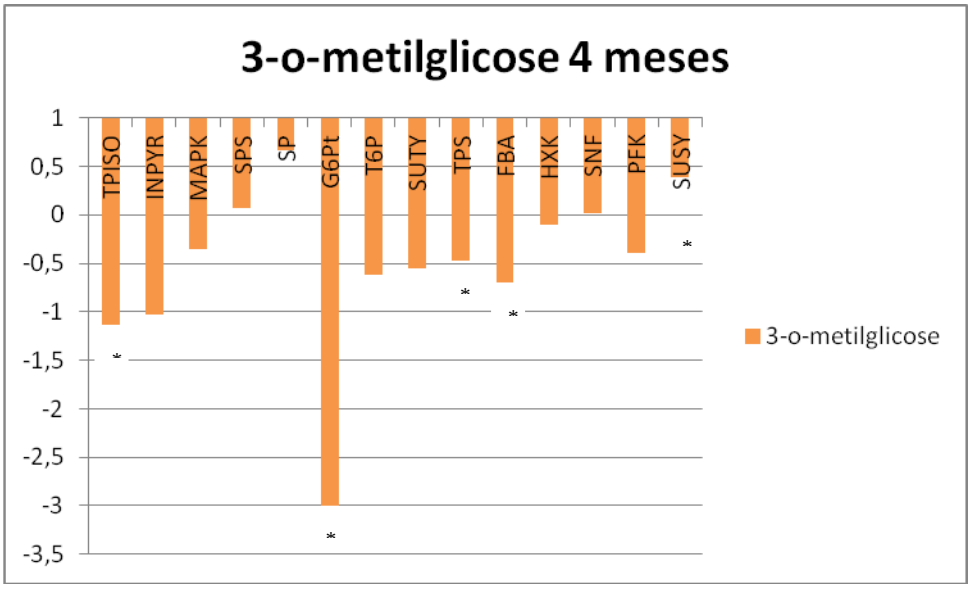
Perfil de expressão dos genes analisados em resposta ao tratamento glicose aos 4 meses. REST: teste de hipótese e intervalo de confiança à 95%. Eixo vertical: Valores de Expressão Gênica em Escala Linear, Eixo horizontal: Genes experimentais. *Estatisticamente significativos



Perfil de expressão dos genes analisados em resposta ao tratamento frutose aos 4 meses. REST: teste de hipótese e intervalo de confiança à 95%. Eixo vertical: Valores de Expressão Gênica em Escala Linear, Eixo horizontal: Genes experimentais. *Estatisticamente significativos

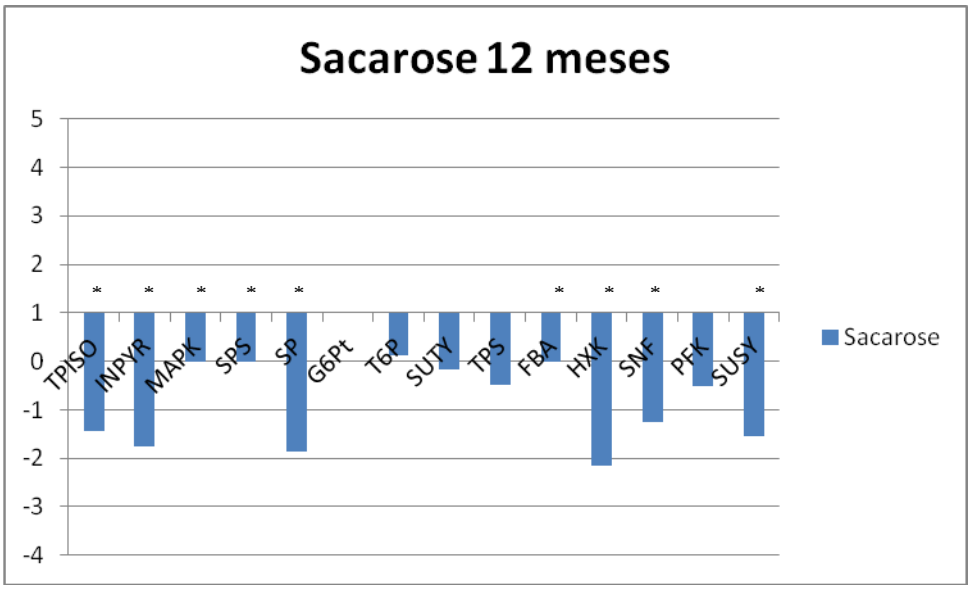


Perfil de expressão dos genes analisados em resposta ao tratamento manose aos 4 meses. REST: Teste de hipótese e intervalo de confiança à 95%. Eixo vertical: Valores de Expressão Gênica em Escala Linear, Eixo horizontal: Genes experimentais. *Estatisticamente significativos

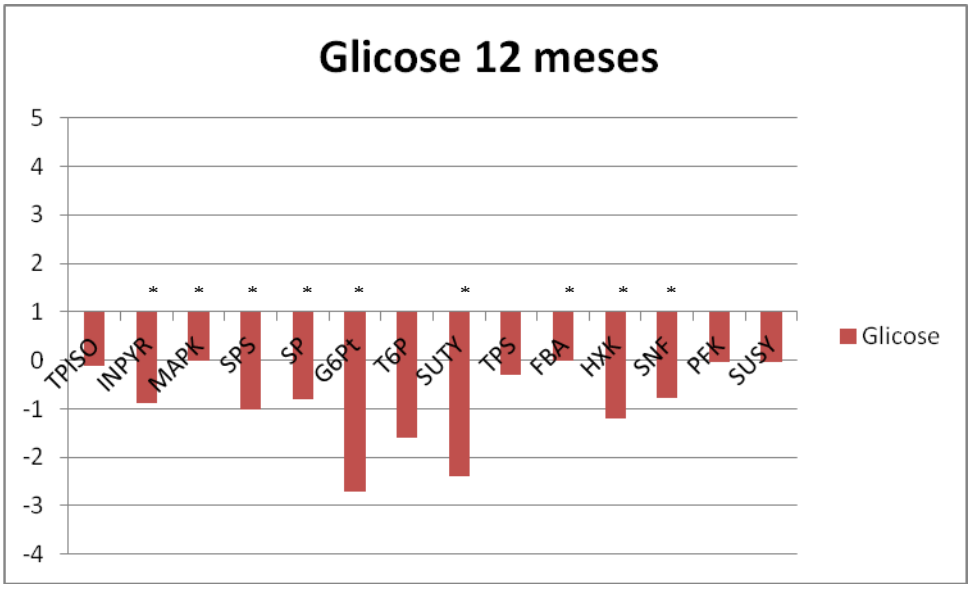


Perfil de expressão dos genes analisados em resposta ao tratamento 3-o-metilglicose aos 4 meses. REST: teste de hipótese e intervalo de confiança à 95%. Eixo vertical: Valores de Expressão Gênica em Escala Linear, Eixo horizontal: Genes experimentais. *Estatisticamente significativos

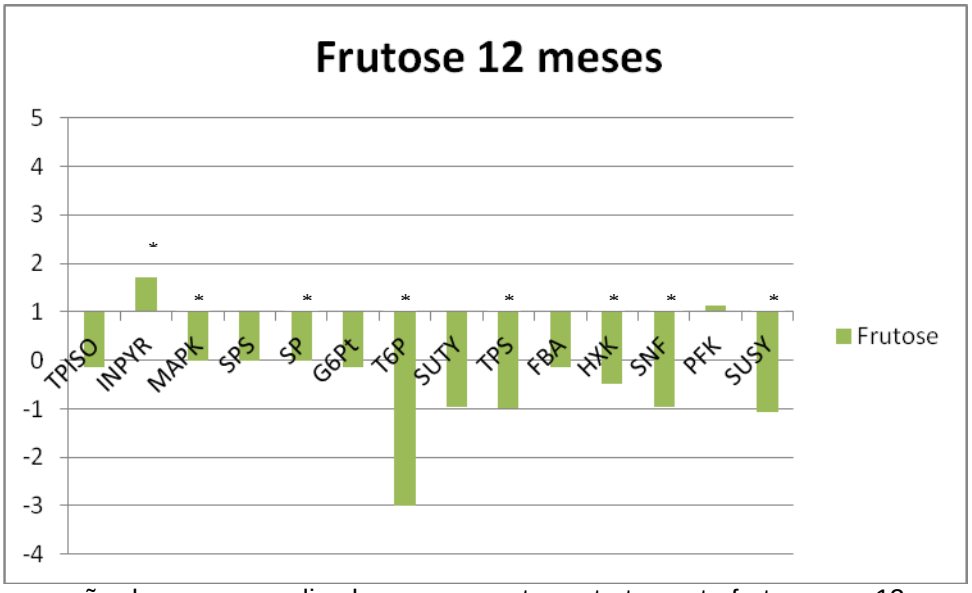
Perfil de Expressão aos 12 meses



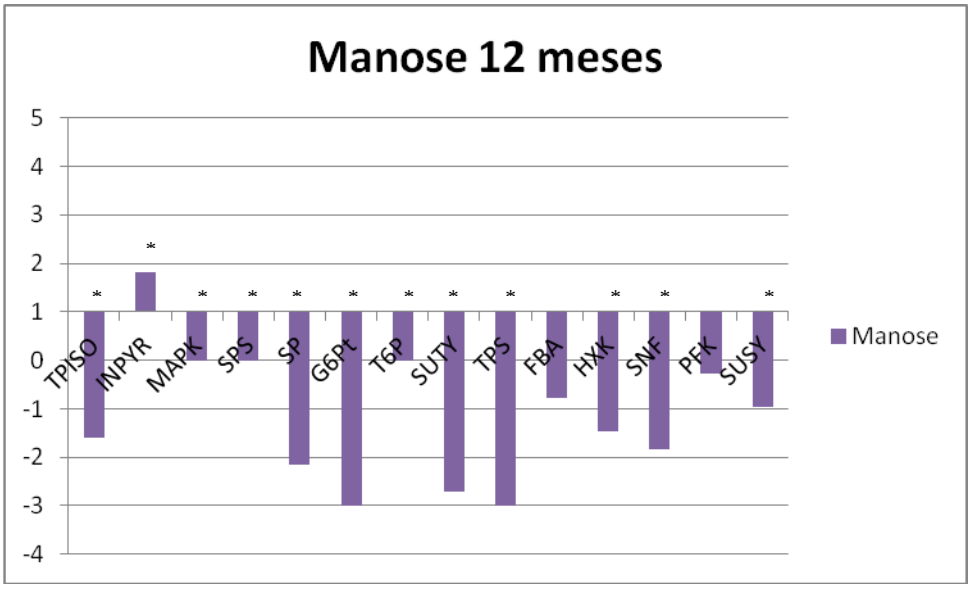
Perfil de expressão dos genes analisados em resposta ao tratamento sacarose aos 12 meses. REST: teste de hipótese e intervalo de confiança à 95%. Eixo vertical: Valores de Expressão Gênica em Escala Linear, Eixo horizontal: Genes experimentais. *Estatisticamente significativos



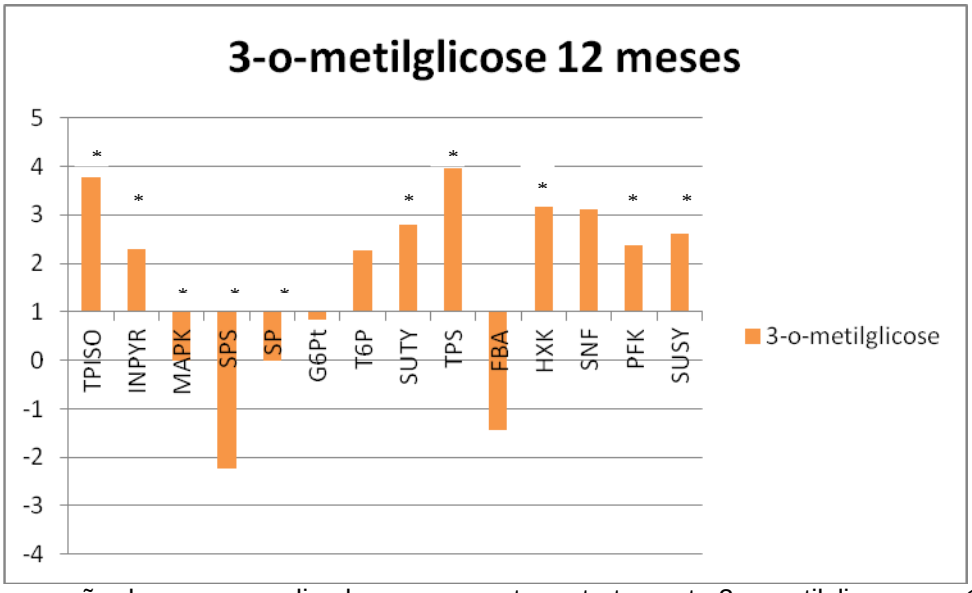
Perfil de expressão dos genes analisados em resposta ao tratamento glicose aos 12 meses. REST: teste de hipótese e tntervalo de confiança à 95%. Eixo vertical: Valores de Expressão Gênica em Escala Linear, Eixo horizontal: Genes experimentais. *Estatisticamente significativos



Perfil de expressão dos genes analisados em resposta ao tratamento frutose aos 12 meses. REST: teste de hipótese e intervalo de confiança à 95%. Eixo vertical: Valores de Expressão Gênica em Escala Linear, Eixo horizontal: Genes experimentais. *Estatisticamente significativos



Perfil de expressão dos genes analisados em resposta ao tratamento manose aos 12 meses. REST: teste de hipótese e intervalo de confiança à 95%. Eixo vertical: Valores de Expressão Gênica em Escala Linear, Eixo horizontal: Genes experimentais. *Estatisticamente significativos



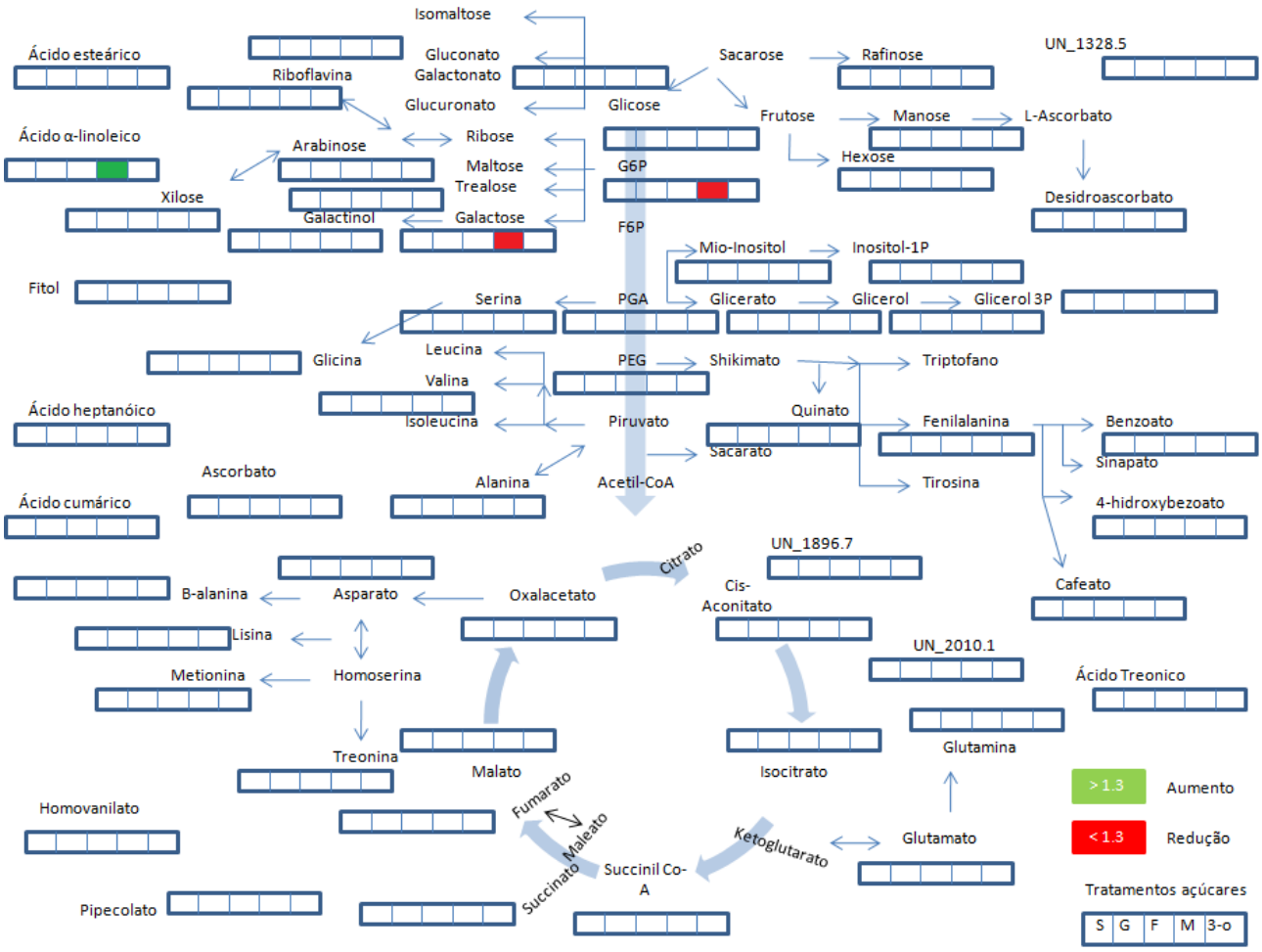
Perfil de expressão dos genes analisados em resposta ao tratamento 3-o-metilglicose aos 12 meses. REST: teste de hipótese e intervalo de confiança à 95%. Eixo vertical: Valores de Expressão Gênica em Escala Linear, Eixo horizontal: Genes experimentais. *Estatisticamente significativos

ANEXO B

Mapas metabólicos e suas reconfigurações pós-tratamentos

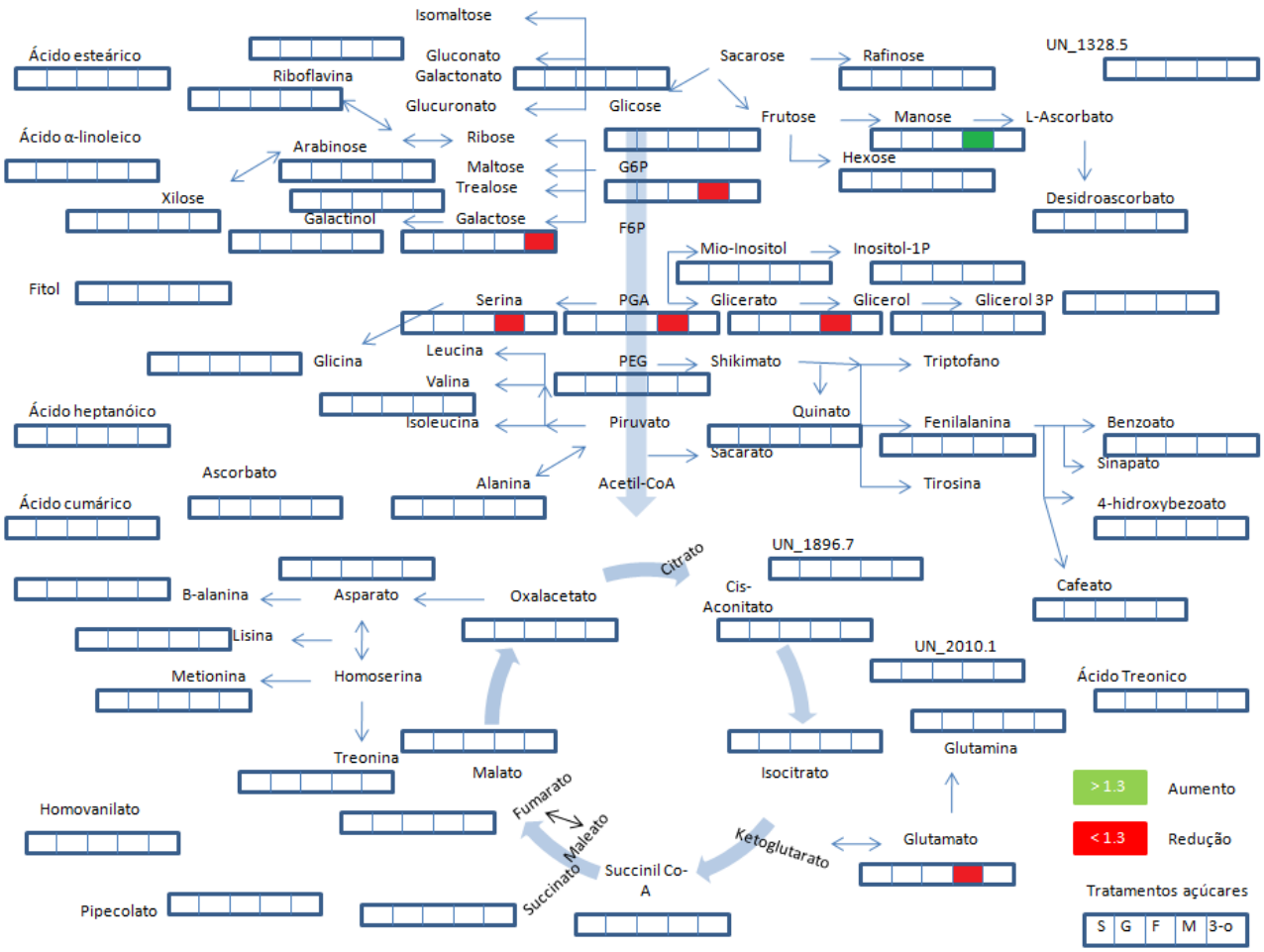
4 meses

Controle: manitol



Perfil de alterações metabólicas obtidas a partir do teste Ratio 1.3. Utilizando o controle manitol para 4 meses. Tratamentos indicados nas caixas: S (sacarose), G (glicose), F (frutose), M (manose), 3-o (3-ometilglicose). Valores em verde, acima do limiar em 30%, valores em vermelho, abaixo do limiar em 30%

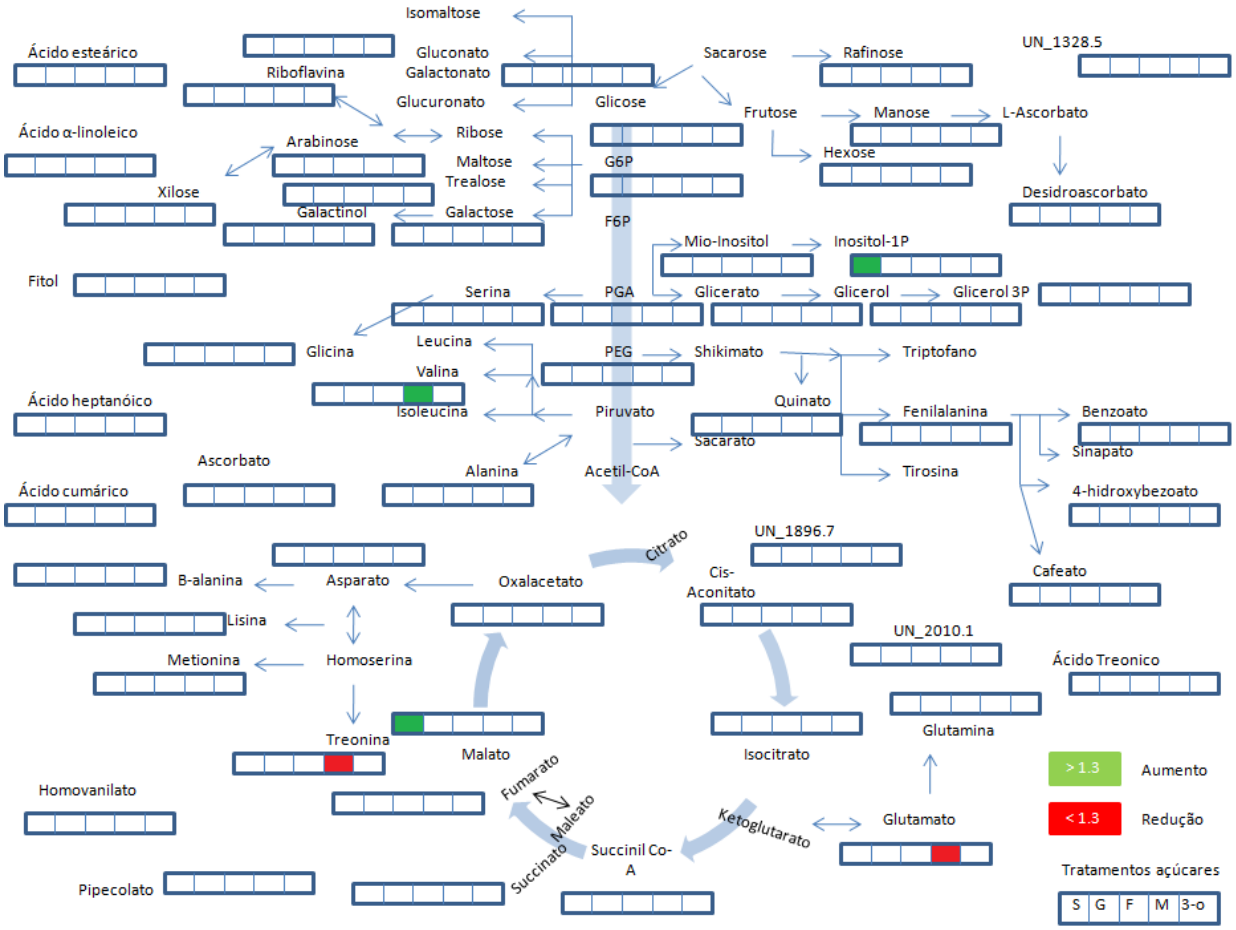
Controle: água



Perfil de alterações metabólicas obtidas a partir do teste Ratio 1.3. Utilizando o controle águal para 4 meses. Tratamentos indicados nas caixas: S (sacarose), G (glicose), F (frutose), M (manose), 3-o (3-ometilglicose). Valores em verde, acima do limiar em 30%, valores em vermelho, abaixo do limiar em 30%

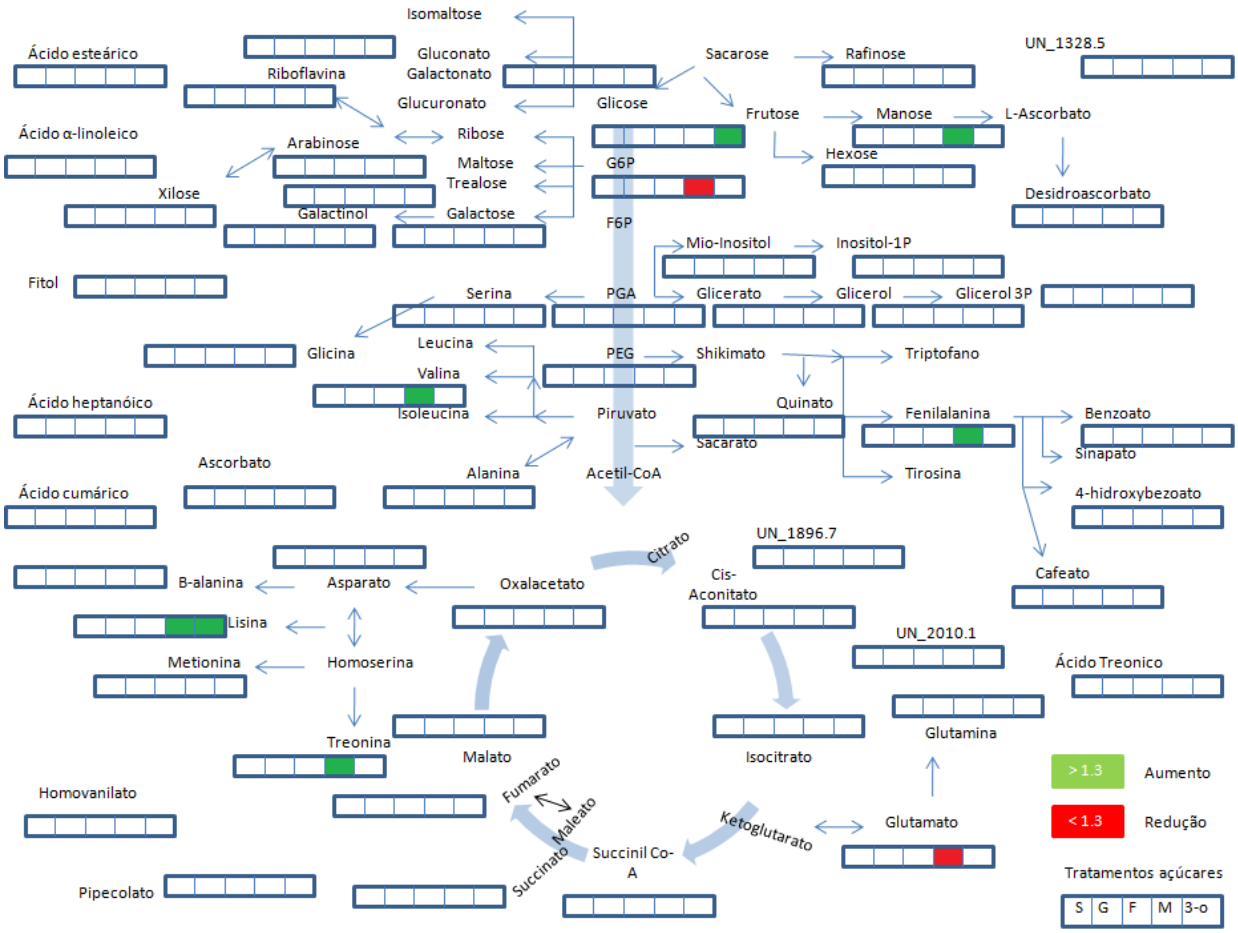
12 meses

Controle: manitol



Perfil de alterações metabólicas obtidas a partir do teste Ratio 1.3. Utilizando o controle manitol para 12 meses. Tratamentos indicados nas caixas: S (sacarose), G (glicose), F (frutose), M (manose), 3-o (3-ometilglicose). Valores em verde, acima do limiar em 30%, valores em vermelho, abaixo do limiar em 30%

Controle: água



Perfil de alterações metabólicas obtidas a partir do teste Ratio 1.3. Utilizando o controle águal para 12 meses. Tratamentos indicados nas caixas: S (sacarose), G (glicose), F (frutose), M (manose), 3-o (3-ometilglicose). Valores em verde, acima do limiar em 30%, valores em vermelho, abaixo do limiar em 30%