**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar
relacionada ao metabolismo da sacarose**

Luis Felipe Boaretto

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2012**

Luis Felipe Boaretto
Engenheiro Agrônomo

Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

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

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2012**

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

Boaretto, Luis Felipe

Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose / Luis Felipe Boaretto. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010. - - Piracicaba, 2011.
177 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Açúcares solúveis 2. Cana-de-açúcar 3. Espectrometria de massas 4. Reação em cadeia por polimerase 5. Sacarose I. Título

CDD 633.61
B662a

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelos momentos felizes e adversos impostos durante este trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate antes de tudo pela sua amizade construída ao longo de 10 anos de convivência. Por confiar em meu trabalho, pela oportunidade e orientação.

A CAPES pelo fornecimento da bolsa de doutorado.

Aos Professores e Funcionários do Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) representado na figura da Dra. Sabrina M. Chabregas por fornecer gentilmente as mudas utilizadas como objeto de estudo deste trabalho.

A Dra. Mônica T. V. Labate pela sua amizade e conselhos na confecção deste trabalho.

Ao Dr. David Moon pelos conselhos e auxílio na finalização do trabalho.

Ao Dr. Juliano Bragatto (Corintiano “Loco”) antes de tudo pela sua amizade e camaradagem – Valeu Cara!!!. Pelo auxílio nas análises de carboidratos realizadas

Ao doutorando Thiago Falda Leite, meu estimado amigo FALDA, pelos bate-papos, auxílios, ideias, risadas e desabafos durante esse tempo.

A doutoranda Ilara Gabriela Frasson Budzinski, minha amiga BUD’S. Muito obrigado pela sua amizade verdadeira. Nossos constantes bate-papos irão fazer falta.

A amiga Livia Franceschini pelas constantes ajudas na parte de informática e bioinformática.

A doutoranda Maria Juliana C. Rodrigues aos longos anos de amizade e convivência harmônica desde a IC até o Doutorado.

Ao grande mestre Pedro Barrueto, pelas valiosas conversas, ensinamentos e conselhos. Pedro você é um profissional que me espelharei, sua humildade é referência para todos nós!

Ao pessoal do “Grupo da Cana”; Danielle Izilda, Simone Guidetti, Larissa Prado, Camila Ribeiro.

As meninas da IC; Julinha, Carol, Gabi e Hana, pelas ajudas durante o trabalho.

Aos novos amigos Leonardo Ferreira, Janaina Borges, Jaime Barros (Jaiminho), Carolzinha (μ-cuim), Felipe Marques (Felipinho) e Ivan Mozol.

A todos que um dia fizeram parte desta equipe!

Meu muito OBRIGADO.

***“Decepar a cana
Recolher a garapa da cana
Roubar da cana a doçura do mel
Se lambuzar de mel”***

(Milton Nascimento e Chico Buarque, 1976)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 A cultura da cana-de-açúcar.....	27
2.2 Açúcares solúveis do colmo da cana-de-açúcar.....	29
2.3 Rota física do descarregamento do floema no parênquima do colmo de cana-de-açúcar.....	31
2.4 O armazenamento da sacarose no colmo da cana-de-açúcar.....	33
2.5 Enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose.....	35
2.5.1 Sacarose fosfato sintase (SPS) (EC 2.4.1.14).....	35
2.5.2 Sacarose sintase (SUSY) (EC 2.4.1.13).....	36
2.5.3 Invertases (IN) (EC 3.2.1.26).....	37
2.5.4 Hexoquinase (HK) (EC 2.7.1.1).....	40
2.5.5 Frutoquinase (FRK) (EC 2.7.1.4).....	41
2.6 Desenvolvimento de ferramentas para a elucidação dos principais pontos de controle da acumulação da sacarose em colmo de cana-de-açúcar.....	42
2.7 Biologia molecular aplicada à cana-de-açúcar.....	44
2.7.1 A cana-de-açúcar e o projeto SUCEST.....	44
2.7.2 Regulação da expressão gênica em colmo de cana-de-açúcar.....	45
2.8 Proteômica.....	47
3 OBJETIVOS.....	51
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Instalação do experimento em casa de vegetação.....	53

4.2 Períodos definidos para as coletas.....	53
4.2.1 Acompanhamento do acúmulo de açúcares no colmo de plantas de cana-de-açúcar.....	54
4.3 Coleta dos colmos de cana-de-açúcar para a avaliação do proteoma e transcrito.....	55
4.4 Coleta dos colmos de cana-de-açúcar para a quantificação dos açúcares solúveis.....	55
4.5 Extração das proteínas totais dos internós 5 e 9 de cana-de-açúcar.....	55
4.5.1 Solubilização das proteínas totais.....	56
4.5.2 Quantificação das proteínas totais.....	56
4.6 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE).....	57
4.7 Eletroforese bi-dimensional.....	57
4.7.1 Focalização isoeletrica (IEF) – primeira dimensão.....	57
4.7.2 Eletroforese da segunda dimensão (2D-PAGE).....	58
4.8 Análise e tratamento das imagens digitalizadas do gel.....	59
4.9 Digestão de proteínas separadas por 2D-PAGE.....	59
4.10 LC-MS/MS.....	60
4.11 Análise dos espectros de massas e identificação das proteínas.....	61
4.12 Seleção dos genes e síntese dos <i>primers</i>	61
4.13 Extração do RNA total.....	63
4.13.1 Quantificação do RNA total extraído.....	64
4.14 Isolamento do RNA mensageiro e Síntese do cDNA.....	64
4.15 PCR quantitativo (qPCR).....	65
4.16 Seleção dos genes de referência.....	65
4.17 Extração dos açúcares solúveis do espaço apoplástico dos colmos de cana-de-açúcar.....	66
4.18 Extração dos açúcares solúveis do simplasto dos colmos de cana-de-açúcar.....	66
4.19 Determinação dos açúcares do colmo de cana-de-açúcar.....	67

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1 Análise do conteúdo de açúcares solúveis do colmo de cana-de-açúcar.....	69
5.2 Análise do transcrito da cana-de-açúcar.....	73
5.2.1 PCR quantitativo (qPCR).....	73
5.2.2 Escolha do gene de referência.....	74
5.2.3 qPCR dos genes das enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose nos internós de cana-de-açúcar.....	75
5.2.4 Comparação da expressão dos transcritos das enzimas dos internós maduros de colmo de cana-de-açúcar.....	90
5.3 Proteoma comparativo entre os internós maduros de colmos de cana-de-açúcar com 7 e 10 meses de idade.....	100
5.3.1 Extração das proteínas.....	101
5.3.2 Géis bi-dimensionais de poliacrilamida (2D-PAGE) dos internós maduros (I9) de 7 e 10 meses de idade.....	102
5.3.3 Análise das imagens dos géis 2D-PAGE.....	103
5.3.4 Busca das proteínas nos banco de dados.....	105
5.3.5 Categorias funcionais das proteínas identificadas dos internós maduros (I9) de colmo de cana-de-açúcar.....	106
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	135
REFERÊNCIAS.....	139
ANEXOS.....	155

RESUMO

Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionados ao metabolismo da sacarose

A cana-de-açúcar é uma importante cultura na economia brasileira, tanto pela produção de açúcar como pela produção de biocombustíveis, contabilizando mais de US\$ 20 bilhões por ano, colocando o Brasil como o país produtor mais importante deste mercado. Por outro lado, a cana-de-açúcar atingiu o limite na produção de sacarose, um efeito da exploração da estreita base de genes utilizados nos cruzamentos dos programas de melhoramento convencional. O objetivo do trabalho foi avaliar a dinâmica da acumulação de sacarose nos colmos da cana-de-açúcar, através da investigação da expressão gênica nos parênquimas de estocagem dos colmos das plantas de cana-de-açúcar durante o desenvolvimento, utilizando técnicas de transcriptômica e proteômica. A variedade SP80-3280 foi cultivada em condições de casa de vegetação e os internós de 4-a-9 foram coletados aos 4, 7 e 10 meses de idade. Com o intuito de aumentar o conteúdo de sacarose, as plantas de 10 meses de idade foram submetidas a um período de estresse hídrico antes da coleta. Para todos os internós foram avaliados o conteúdo de açúcares solúveis e os internós 5 e 9 foram usados para análises do transcrito e proteoma. Os perfis de expressão dos genes envolvidos no ciclo da sacarose para 4, 7 e 10 meses de idade foram estudados utilizando-se qPCR. A técnica da proteômica de 2D-PAGE foi utilizada para a comparação do perfil de expressão das proteínas entre os internós maduros, nas idades de 7 e 10 meses, e os *spots* selecionados foram identificados por LC-ESI-Q-TOF-MS/MS. O total de açúcares solúveis no parênquima de estocagem aumentou cerca de 2,5 vezes quando comparamos os internós maduros do colmo das plantas de 7 e 10 meses de idade. Este aumento pode ser explicado pela mudança da expressão dos genes envolvidos no metabolismo da sacarose. Sinais endógenos e exógenos à planta são responsáveis por dispararem o mecanismo de síntese da sacarose, o qual é frequentemente regulado pelas enzimas. Nós identificamos 81 proteínas de 7 e 10 meses, as quais incluem proteínas diferencialmente expressas e preferencialmente expressas. Os dados gerados pelo perfil de expressão gênica e análise do proteoma foram comparados no sentido de entender o mecanismo molecular envolvido no processo de acúmulo de sacarose.

Palavras-chave: Açúcares solúveis; Acúmulo de sacarose; Espectrometria de massas; PCR quantitativo; *Saccharum spp*

ABSTRACT

Transcriptomic and proteomic analysis of sugarcane culm relationaded to sucrose metabolism

Sugarcane is a important crop in the Brazilian economy for both, sugar and green biofuel production, accounting for more than US\$ 20 billions/year, placing Brazil as the most important country in this trade. On the other hand sugarcane has reached a limit in sucrose production, an effect of the narrow gene pool used in current commercial breeding programs. Our objective was to assess the dynamics of sucrose accumulation in sugarcane stalks, by investigating the gene expression in the storage parenchyma of sugarcane plants during development, using transcriptomic and proteomic approches. Sugarcane variety (SP80-3280) was cultivated under greenhouse conditions and internodes 4-to-9 were harvested at 4, 7 and 10 months. In order to increase the sugar content, 10 month old plants were subjected to a period of water stress before sampling. All internodes were analyzed to evaluate the soluble sugars content, the internodes 5 and 9 were used in transcriptomic, and 9 was used in proteomic analyses. Expression profiles of genes involved in sucrose cycling from the 4, 7 and 10 month old plants were studied using qRT-PCR. Proteomic approaches (2D-PAGE) were done by comparing protein expression profiles between mature internode in 7 and 10 month, and the selected spots were identified by LC-ESI-Q-TOF-MS/MS. Total soluble sugars in the storage parenchyma increased around 2,5-fold when 7 and 10 month old internodes were compared. This rise could be explained by a change in the expression of genes involved in sucrose metabolism. Endogenous and exogenous signals trigger the mechanism of sucrose synthesis which is often regulated by enzymes and signaling sugars. We identified 81 proteins from the 7 and 10 month old which included differentially expressed and exclusive spots. The data from the gene expression and proteome analyses are compared in order to understand the molecular mechanisms involved in sucrose storage.

Keywords: Quantitative PCR; Mass spectrometry; *Saccharum* spp; Soluble sugars; Sucrose accumulation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ciclo fenológico da cana-de-açúcar. (a): pedaços do colmo usados no plantio; (b): início da germinação da gema; (c): início do perfilhamento; (d): máximo perfilhamento; (e): início da maturação; (f): máxima maturação dos colmos; (g): colheita; (h): brotação da soqueira..... 28
- Figura 2 - Secção transversal do internó número 4 do colmo de cana-de-açúcar. A. Feixe vascular corado com sulfato de berberina para a localização de lignina e suberina. As setas indicam locais onde ocorre camada única das células da bainha vascular. B. Parênquima de estocagem.... 31
- Figura 3 - Esquema das reações do modelo de acúmulo de sacarose em colmo de cana-de-açúcar. Os metabólitos são representados pelos retângulos ou círculos em cinza claro. As enzimas são representadas pelos retângulos em branco. O valor 2 representa o coeficiente de estequiometria. Abreviações das enzimas - HK: hexoquinase; FRK: frutoquinase; UDPGDH: UDP-glicose desidrogenase; PFK: fosfofrutoquinase; PFP: fosfofrutoquinase dependente de pirofosfato; NI: invertase neutra; SUSY: sacarose sintase; ALD: aldolase; SPS: sacarose fosfato sintase; SPP: sacarose fosfatase; VAC: transportador de sacarose vacuolar. Metabólitos – Glc: glicose; Fru: frutose; Suc: sacarose; S6P: sacarose 6-fosfato; HexP: hexose fosfato; FbP: frutose 1,6-bisfosfato; UDPGA: UDP-ácido glucurônico; TrP: triose fosfato..... 34
- Figura 4 - Localizações sub-celulares das isoformas da invertase. SUC – sacarose; Glc – glicose; Fru – frutose; eST; ST – transportador de sacarose; HT – transportador de glicose; Inv-CW – invertase ácida ligada à parede celular; Inv-N – invertase neutra e Inv-V – invertase vacuolar..... 38
- Figura 5 - Instalação do experimento em casa de vegetação, mudas de cana-de-açúcar com 30 dias após germinação. A - vaso de 110L preenchido com latossolo. B - mudas de cana SP80-3280 transplantadas em triplicata em cada vaso. C - panorama geral do canteiro com as mudas de cana..... 53
- Figura 6 - Plantas de cana-de-açúcar na casa de vegetação em três idades diferentes. A- 4 meses. B- 7 meses. C- 10 meses, sob estresse hídrico..... 54
- Figura 7 - Curva de acompanhamento do acúmulo dos sólidos solúveis, com auxílio do refratômetro ótico aos 0, 4; 6; 8; 10; 12; 14, e 16 d.s.i. O ponto indicado pela seta destaca o período definido para das plantas com 10 meses de idade para análises moleculares e de conteúdo de açúcares. D.s.i. – dias sem irrigação..... 70

Figura 8	- Valores dos açúcares solúveis dos internós (I) 4-a-9 presentes no caldo da cana nas três idades de coleta, 4, 7 e 10 meses.....	71
Figura 9	- Valores médios da concentração dos açúcares solúveis totais, glicose, frutose e sacarose (linha tracejada) relacionados com a altura média das plantas nos três estádios diferentes de desenvolvimento, perfilhamento: 4 meses; crescimento vegetativo: 7 meses e maturação: 10 meses (linha cheia). ** $p < 0.01$ pelo teste de Tukey.....	72
Figura 10	- Valores de estabilidade gerado pelo programa <i>NormFinder</i> dos genes potencialmente considerados como referência. Poliubiquitina (PUB); gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH); “sucrose transporter 1” (SUT1), “sucrose transporter 4” (SUT4) e melhor combinação entre dois genes (PUB+SUT1).....	75
Figura11	- Nível de expressão normalizada dos transcritos dos genes SPS1, SPS2 e SPP nos internós imaturos e maduros nos três estádios distintos de desenvolvimento. SPS1-sacarose fosfato sintase 1; SPS2-sacarose fosfato sintase 2; SPP-sacarose fosfato fosfatase; I5-internó número 5; I9-internó número 9; 4m-4 meses de idade; 7m-7 meses de idade e 10m-10 meses de idade. Os valores do eixo y foram normalizados com a média geométrica dos dois genes de referências PUB e SUT1 utilizados como padrão interno. ** $p < 0,01$ pelo teste de Tukey entre os internós dentro das idades.....	76
Figura 12	- Nível de expressão normalizada do transcrito do gene SUSY nos internós imaturos e maduros nos três estádios distintos de desenvolvimento. SUSY-sacarose sintase; I5-internó número 5; I9-internó número 9; 4m-4 meses de idade; 7m-7 meses de idade e 10m-10 meses de idade. Os valores do eixo y foram normalizados com a média geométrica dos dois genes de referências PUB e SUT1 utilizados como padrão interno. ** $p < 0,01$ pelo teste de Tukey entre os internós dentro das idades.....	79
Figura 13	- Nível de expressão normalizada do transcrito do gene ACIN nos internós imaturos e maduros nos três estádios distintos de desenvolvimento. ACIN-invertase ácida; I5-internó número 5; I9-internó número 9; 4m-4 meses de idade; 7m-7 meses de idade e 10m-10 meses de idade. Os valores do eixo y primário foram normalizados com a média geométrica dos dois genes de referências PUB e SUT1 utilizados como padrão interno. O eixo y secundário é a concentração de açúcares (g/L). ** $p < 0,01$ pelo teste de Tukey entre os internós dentro das idades.....	82
Figura14	- Nível de expressão normalizada do transcrito do gene CWIN nos internós imaturos e maduros nos três estádios distintos de desenvolvimento. CWIN-invertase ácida ligada à parede celular; I5-	

- internó número 5; I9-internó número 9; 4m-4 meses de idade; 7m-7 meses de idade e 10m-10 meses de idade. Os valores do eixo y foram normalizados com a média geométrica dos dois genes de referências PUB e SUT1 utilizados como padrão interno. ** $p < 0,01$ pelo teste de Tukey entre os internós dentro das idades..... 85
- Figura 15 - Nível de expressão normalizada do transcrito do gene NTIN nos internós imaturos e maduros nos três estádios distintos de desenvolvimento. NTIN-invertase neutra; I5-internó número 5; I9-internó número 9; 4m-4 meses de idade; 7m-7 meses de idade e 10m-10 meses de idade. Os valores do eixo y primário foram normalizados com a média geométrica dos dois genes de referências PUB e SUT1 utilizados como padrão interno. O eixo y secundário é a concentração (g/L). ** $p < 0,01$ pelo teste de Tukey entre os internós dentro das idades..... 86
- Figura 16 - Nível de expressão normalizada do transcrito do gene HK1 (A), HK2 (B), FRK1 (C) e FRK2 (D) nos internós imaturos e maduros nos três estádios distintos de desenvolvimento. HK1-hexoquinase 1; HK2-hexoquinase 2; FRK1-frutoquinase 1; FRK2-frutoquinase 2; I5-internó número 5; I9-internó número 9; 4m-4 meses de idade; 7m-7 meses de idade e 10m-10 meses de idade. Os valores do eixo y foram normalizados com a média geométrica dos dois genes de referências PUB e SUT1 utilizados como padrão interno. ** $p < 0,01$ pelo teste de Tukey entre os internós dentro das idades..... 89
- Figura 17 - Expressão relativa de 16 genes localizados no parênquima de estocagem do internó maduro (I9) de cana-de-açúcar com 10 meses de idade. Os genes avaliados estão envolvidos com a rota de acúmulo de sacarose. Os valores do eixo x são em relação ao internó maduro (9) das canas com 7 meses de idade. ACIN-invertase ácida; CWIN-invertase ácida ligada à parede celular; NTIN-invertase neutra; SPS1-sacarose fosfato sintase; SPS2-sacarose fosfato sintase 2; SPP-sacarose fosfato fosfatase; SNRK-quinase protéica relacionada à não fermentação da sacarose; FRU1-frutoquinase 1; FRU2-frutoquinase; HK1-hexoquinase 1; HK2-hexoquinase 2; G6PI-glicose 6-fosfato isomerase; SUSY-sacarose sintase; TPS-trehalose 6-fosfato sintase; SUT4-transportador de sacarose 4 e GAPDH-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. ** $p < 0,01$ pelo teste de Tukey..... 92
- Figura 18 - Rota metabólica do metabolismo de carboidrato. Os retângulos indicam as principais enzimas que participam do processo..... 93
- Figura 19 - Parte da rota principal da glicólise. O retângulo em cinza destaca a ação da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)..... 97
- Figura 20 - Reações enzimáticas envolvendo a síntese e degradação da

trehalose. Os retângulos coloridos em cinza representam as enzimas relacionadas à síntese da trehalose, os retângulos coloridos em branco representam a parte da rota envolvida com a degradação da trehalose. TPS-trehalose 6-fosfato sintase; TPP-trehalose fosfato fosfatase; GLI-glicose; GLI 1-P-glicose 1-fosfato e GLI 6-P-glicose 6-fosfato.....

98

Figura 21 - Esquema geral do metabolismo de acúmulo da sacarose no internó 9 de plantas de cana-de-açúcar com 10 meses de idade. O quadrado colorido em azul representa superexpressão dos transcritos e o quadrado em vermelho representa repressão dos transcritos. ACIN-invertase ácida; CWIN-invertase ácida ligada à parede celular; NTIN-invertase neutra; SPS1-sacarose fosfato sintase; SPS2-sacarose fosfato sintase 2; SPP-sacarose fosfato fosfatase; SNRK- quinase protéica relacionada à não fermentação da sacarose; FRU1-frutoquinase 1; FRU2-frutoquinase; HK1-hexoquinase 1; HK2-hexoquinase 2; G6PI-glicose 6-fosfato isomerase; SUSY-sacarose sintase; TPS-trehalose 6-fosfato sintase; SUT4-transportador de sacarose 4 e GAPDH-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; SAC-sacarose; SAC 6-P-sacarose 6-fosfato; GLI-glicose; UDP-GLI-UDP-glicose; GLI 6-P-glicose 6-fosfato; FRU-frutose; FRU 6-P-frutose 6-fosfato.....

99

Figura 22 - Gel desnaturante de poliacrilamida (12,5%) carregado com amostra de proteínas totais extraída com fenol do tecido de estocagem dos internós maduros de colmo de cana-de-açúcar com 7 e 10 meses. 7m I9-internó número 9 de plantas de 7 meses; 10m I9-internó número 9 de plantas de 10 meses; M-marcador de peso molecular; kDa-kilodaltons.....

102

Figura 23 - Géis bi-dimensionais desnaturante de poliacrilamida (12,5%) montados em triplicata e corados com corante coloidal *Coomassie Blue G-250*. O material utilizado foi tecido do parênquima de estocagem dos internós maduros de colmo de cana-de-açúcar com 7 e 10 meses. O conjunto de seta no canto superior esquerdo indica a direção da separação do extrato de proteína total. Seta na horizontal, separação das proteínas com base no ponto isoelétrico das proteínas (pH 4-7 utilizado), seta na vertical separação das proteínas com base no peso molecular (PM). 7m I9-internó número 9 de plantas de 7 meses; 10m I9-internó número 9 de plantas de 10 meses.....

103

Figura 24 - Imagem de detecção dos *spots* dos géis de referência gerada pelo programa *Image Master Platinum 7.0*, destacando as faixas de pH na parte superior de cada gel e as marcas internas acrescentadas para facilitar o alinhamento entre os tratamentos, análise de classes. A imagem da esquerda se refere ao internó número 9 com 10 meses e a imagem da direita ao internó número 9 com 7 meses.....

104

Figura 25	- Classificação funcional das 81 proteínas identificadas com um único <i>hit</i> . O universo de proteínas identificadas nesta figura representa as proteínas diferencialmente expressas e as proteínas preferencialmente expressas para o internó maduro de 10 e 7 meses. Das 18 categorias descritas por Vettore et al. (2003), 12 foram mostradas.....	126
Figura 26	- Classificação funcional das 27 proteínas diferencialmente expressas, identificadas com um único <i>hit</i> , entre os internós I9 de 10 meses e internó I9 de 7 meses.....	127
Figura 27	- Classificação funcional das 31 proteínas preferencialmente expressas, identificadas com um único <i>hit</i> , do internó maduro I9 aos 10 meses.....	129
Figura 28	- Classificação funcional das 23 proteínas preferencialmente expressas, identificadas com um único <i>hit</i> , do internó maduro I9 aos 7 meses.....	131
Figura 29	- Rota metabólica da biossíntese de celulose, hemicelulose e pectina. As enzimas sacarose sintase (EC 2.4.1.13) e UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22) estão destacadas pela na caixa cinza.....	132
Figura 30	- Interconversão entre frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato. Os retângulos pretos destacam a participação da enzima frutose 1,6-bisfosfato aldolase, enzima reversível, ponto regulatório entre a via da glicólise e gliconeogênese.....	133
Figura 31	- Rota da biossíntese de monolignóis. PAL-fenilalanina amônia liase; C4H-cinamato 4-hidroxilase; C3H-cumarato 3-hidroxilase; 4CL-4 cumarato CoA ligase; COMT-ácido cafeico O-metiltransferase; F5H-ferulato 5-hidroxilase; CCoA3H-cafeil CoA 3-hidroxilase; CCoAOMT-cafeil CoA 3-O-metiltransferase; CCR-cinamil CoA redutase; CAD-álcool cinâmico desidrogenase; SAD-álcool sinápico desidrogenase.....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Composição química, em porcentagem, de cana madura, normal e sadia, segundo Leme Júnior e Borges (1965).....	30
Tabela 2	- Concentração dos principais solutos presentes na solução do apoplasto e simplasto dos internós do colmo de cana numerados a partir do topo em direção a base. Os valores em parênteses representam a porcentagem total de solutos. Dados não publicados de Welbaum e Meinzer (1990).....	30
Tabela 3	- Ajustes dos parâmetros do equipamento <i>Ettan IPGphor3</i> para focalização de fitas pH 4-7.....	58
Tabela 4	- <i>Primers</i> selecionados para a análise dos transcritos das enzimas segundo a rota relacionada ao acúmulo de sacarose em plantas de cana-de-açúcar.....	62
Tabela 5	- Concentração dos açúcares solúveis totais presentes no caldo da cana-de-açúcar para os internós 4 a 9 para as idades de 4 meses, 7 meses e 10 meses. Os valores são expressos em (g/L) do caldo extraído.....	69
Tabela 6	- Estatística do alinhamento intra-específico das replicatas, separadamente dos internós número 9 nas idades de 10 e 7 meses. Ref.-gel de referência; r-replicata; r^2 -coeficiente de correlação.....	105
Tabela 7	- Estatística do alinhamento inter-específico das replicatas dos internós número 9 nas idades de 10 e 7 meses. Todos alinhamentos foram com base em gel virtual gerado pelo programa <i>Image Master 7.0 Platinum</i> . r-replicata; r^2 -coeficiente de correlação.....	105
Tabela 8	- Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduros I9 de 10 meses e internós maduros I9 de 7 meses.....	107
Tabela 9	- Proteínas preferencialmente expressas dos internós maduros I9 de 10 meses.....	115
Tabela 10	- Proteínas preferencialmente expressas dos internós maduros I9 de 7 meses.....	121
Tabela 11	- Proteínas preferencialmente expressas nos internós maduro I9 de 10 meses. Proteínas identificadas com mais de um <i>hit</i>	160
Tabela 12	- Proteínas preferencialmente expressas nos internós maduros I9 de 10 meses. Proteínas identificadas com mais de um <i>hit</i>	171

Tabela 13 - Proteínas preferencialmente expressas nos internós maduros I9 de 7 meses. Proteínas identificadas com mais de um <i>hit</i>	177
---	-----

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio da cana-de-açúcar movimenta cerca de R\$ 40 bilhões por ano no país. Elevados investimentos realizados pelo setor, fruto de parcerias e da forte competitividade de mercado, consolidaram a importância da cana-de-açúcar. A cadeia produtiva da cana como atividade na economia é responsável por 1,5% do produto interno bruto nacional. Presente em 22 estados brasileiros, o agronegócio da cana-de-açúcar é responsável por trazer investimentos locais e mais oportunidade à população que trabalha diretamente no setor, elevando a qualidade de vida das famílias que dependem da sua cadeia. Somente no ano de 2009, a cadeia de produção do bioetanol ultrapassou a marca de 800 mil empregos diretos gerados, ratificando a força do setor num período pós-crise global (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2010).

A lavoura da cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil. Acompanhando essa tendência, novas usinas têm iniciado suas atividades. Somente no ano safra de 2010/2011 foram 10 novas usinas que entraram em funcionamento principalmente nas regiões sudeste e centro-oeste. O relatório apresentado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) aponta que a área de cana de açúcar colhida e destinada à atividade sucroalcooleira foi de 8.442.800 hectares, distribuídos entre todos os estados produtores. O Estado de São Paulo é o maior produtor e responsável por 4.458.310 hectares colhidos, o que representa 52,80% do total. Em segundo lugar está Minas Gerais com 740.150 hectares (8,77%), seguido Goiás com 673.380 hectares (7,97%), Paraná com 619.360 hectares (7,33%), Mato Grosso do Sul com 480.860 hectares (5,69%), Alagoas com 450.750 (5,34%), e Pernambuco com 324.030 hectares (3,80%). Os sete estados listados acima, detêm mais de 91% da área colhida do Brasil, e possuem produtividade média de 79,7 ton. ha⁻¹ (CONAB, 2011).

A safra 2011/2012 ultrapassou 641.900.000 toneladas de cana moída, um aumento de 2,9% em relação ao ano safra anterior (2010/2011), o que significa quase 18.000.000 de toneladas a mais. Do total da cana esmagada, 308.888.200 toneladas, (48,11%) foram destinados à produção de açúcar, gerando mais de 39 milhões de toneladas desse produto. O bioetanol foi responsável por 51,89% do montante moído,

com 333.101.800 toneladas, gerando volume total de mais de 27 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2011). Sustentada como uma das principais culturas que contribuem para o agronegócio nacional e que garante ao Brasil destaque no cenário energético internacional, o bioetanol de cana dentro da sua filosofia de ser um combustível limpo e renovável está em constante expansão. No âmbito nacional, o mercado automobilístico cresce a passos largos com a venda de automóveis dotado da tecnologia *flex-fuel*, alcançando a marca de 10 milhões de carros em circulação.

Muitos processos fisiológicos podem limitar a quantidade de sacarose acumulada no colmo da cana. Dentre estes processos, podemos destacar: i. a taxa fotossintética das folhas e a partição do carbono transformado em fotoassimilado para outros locais que não o colmo; ii. o carregamento do floema na folha e o descarregamento do floema no colmo; iii. o metabolismo local do parênquima do colmo da cana; iv. a desuniformidade no tempo de maturação principalmente quanto a restrições no desenvolvimento da planta (MOORE, 1997; LALONDE et al., 2003; WALSH et al., 2005; UYS et al., 2007).

Em cana-de-açúcar, a coordenação do sistema fonte-dreno tem sido alvo de estudos há muito tempo. Alguns autores têm demonstrado diferenças expressivas nas taxas de fotossíntese das folhas relacionadas com a maturidade do colmo. O desfolhamento parcial das plantas de cana não resulta em mudanças significativas na concentração de sacarose do colmo quando comparada com plantas que não sofreram o processo de desfolha, indicando que ocorre um processo de remanejamento por parte das folhas intactas para manterem a demanda de carbono requerida pelo tecido dreno (GUTIÉRREZ-MICELI et al., 2004).

O processo de acumulação nas células do parênquima do colmo da cana de açúcar representa um componente adicional no processo. A acumulação, principalmente nos vacúolos, contribui para manter a força dreno do colmo, resultando em extraordinária produção de sacarose observada neste tecido. Para o modelo proposto, é relevante o processo metabólico do colmo, como por exemplo, o crescimento e a respiração. Estes irão resultar num ajustamento do descarregamento

do floema tanto via simplasto como apoplasto, modificando a forma de como o açúcar é utilizado na célula (LALONDE et al., 2003).

O melhoramento convencional foi o que mais contribuiu para o aumento da produção de sacarose por unidade de área de cana plantada. Entretanto, mesmo amplamente utilizados, os programas de melhoramento de cana espalhados por todo o mundo estão muito abaixo das taxas de incremento de produção alcançados pelas grandes culturas, tais como milho, arroz e trigo (GROF et al., 2007). Essa estagnação no incremento da produtividade é resultado, principalmente, dos programas de melhoramento terem maximizado o teor de açúcares no colmo da cana (GROF; CAMPBELL, 2001). A principal causa deste problema é o constante cruzamento entre as espécies de *Saccharum* disponíveis nos bancos de germoplasma (JACKSON, 2005). O desafio no momento é aumentar o potencial da cana em acumular açúcares no colmo sem que haja a perda de características favoráveis como tolerância ao estresse hídrico, resistência à pragas e doenças e adaptação aos mais diferentes ambientes edafoclimáticos (JACKSON, 2005; WU; BIRCH, 2007). Com base no modelo proposto para o acúmulo de sacarose no parênquima do colmo da cana-de-açúcar durante o processo de maturação, os genes envolvidos aumentam sua expressão, resultando no aumento da atividade das enzimas da rota da sacarose, as quais promovem a reação para a formação do açúcar, resultando na estocagem desse carboidrato no vacúolo das células do parênquima do colmo. Por outro lado, genes de enzimas envolvidas na clivagem da sacarose podem sofrer regulação e diminuir sua atividade catalítica. O entendimento sobre a expressão gênica associada aos elevados níveis de acúmulo de sacarose revelados através da análise do perfil de expressão global, poderão contribuir para o aumento do potencial de produção (MOORE, 2005).

Portanto, aumentos substanciais na produtividade da cana são esperados como resultados da aplicação da biotecnologia num futuro próximo. As cultivares geneticamente modificadas poderão desempenhar um papel chave para os produtores trazendo maiores produtividades e cultivares mais resistentes (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae, considerada originária do sudeste asiático, na região da Indonésia e Nova Guiné (DANIELS; ROACH, 1987). Da Nova Guiné, a cana disseminou-se por vários centros do sul do Pacífico, Indochina e Malásia, sendo certo seu aparecimento como planta produtora de açúcar na Índia (DELGADO; CÉSAR, 1977). Da Pérsia, a cana foi levada pelos árabes para a Espanha, Sicília, Marrocos e Egito. No século XV, os espanhóis e portugueses a introduziram na Ilha da Madeira, Ilhas Canárias, Cabo Verde e São Tomé, na África Ocidental (BAYMA, 1974).

As primeiras mudas de cana-de-açúcar foram trazidas da Ilha da Madeira ao Brasil por Martim Afonso de Souza, em 1532. Os três primeiros engenhos do Brasil foram construídos nas redondezas da atual cidade de Santos, o primeiro em 1532 por Pero Luiz Goés, o segundo engenho, pela família Adorno em 1533 e o terceiro por Martim Afonso de Sousa em 1534 (BERNARDES; CÂMARA, 2001).

A cana-de-açúcar, em função do seu ciclo perene, sofre influências das variações climáticas durante todo o ano. Para garantir alta produção de sacarose, a planta precisa ser manejada para que encontre temperatura e umidade adequadas que permitam o máximo crescimento vegetativo, seguido de um período de restrição hídrica e/ou térmica para que favoreça o acúmulo da sacarose no colmo. A temperatura ótima para a cana situa-se entre 22-30°C, sendo a temperatura basal de 20°C e a temperatura máxima de 38°C (MAGALHÃES, 1987). É uma cultura que necessita de precipitação média de 1.200 a 1.300 mm anuais, bem distribuídos, além do período chuvoso coincidir com os meses iniciais de desenvolvimento da planta. Pode ser cultivada em diversos tipos de solos desde argiloso à arenoso, requerendo solos profundos de textura média e boa capacidade de retenção de água, com pH na faixa de 5,5 a 6,5 (ZINK et al., 1978).

A cana-de-açúcar possui basicamente quatro grandes fases no seu desenvolvimento: germinação; perfilhamento; crescimento vegetativo e fase de maturação (BENDA, 1969), Figura 1.

Figura 1 - Ciclo fenológico da cana-de-açúcar. (a): pedaços do colmo usados no plantio; (b): início da germinação da gema; (c): início do perfilhamento; (d): máximo perfilhamento; (e): início da maturação; (f): máxima maturação dos colmos; (g): colheita; (h): brotação da soqueira. Ilustração de Rogério Lupo (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011)

As cultivares modernas são produtos do cruzamento principalmente entre duas espécies do gênero *Saccharum*, que foi realizado pelos melhoristas no século XIX. As espécies que mais contribuíram para o desenvolvimento de tais cultivares, chamadas de modernas, foram *S. officinarum*, espécie mais amplamente difundida, com capacidade de acumular altos teores de sacarose no colmo, e *S. spontaneum*, espécie muito vigorosa, adaptada a ambientes hostis e que contribuiu para a transferência de genes de resistência a estresses bióticos e abióticos. Outras espécies como *S. sinense*, *S. barberi* e *S. robustum* também contribuíram para o desenvolvimento de algumas variedades modernas (MATSUOKA et al., 1999). O melhoramento da cana é baseado na seleção e clonagem de “genótipos superiores” provenientes de uma população segregante a qual foi obtida pelo cruzamento de indivíduos de características contrastantes. Para que se maximize a eficiência deste longo processo, o programa é dividido em várias fases, que incluem desde a escolha dos parentais até testes realizados em diversos ambientes.

2.2 Açúcares solúveis do colmo da cana-de-açúcar

A sacarose é o fotoassimilado mais comumente translocado nas plantas superiores (TAIZ; ZEIGER, 2004). Na cana, os açúcares solúveis de maior importância econômica são; a sacarose, presente em maior percentual, a glicose e a frutose em menores teores. A sacarose é um açúcar não-redutor composto por uma unidade de glicose e uma unidade de frutose. Os dois monômeros são ligados entre o C1 da unidade glicosil e o C2 da unidade frutossil. A ligação entre os dois carboidratos é chamada ligação glicosídica. O que é mais notável na sacarose e muito pouco abundante em outros dissacarídeos é o fato da ligação glicosídica ser formada entre as duas extremidades redutoras dos monômeros de glicose e frutose.

O efeito no padrão normal de maturação na acumulação de carboidratos tanto nos internós quanto ao longo do colmo da cana-de-açúcar, pode ser estimado através da medida do Brix. O Brix representa o teor percentual em massa de sólidos solúveis do

caldo de cana, podendo ser determinado por refratometria ou por densidade (MOORE, 1995).

Tabela 1 - Composição química, em porcentagem, de cana madura, normal e sadia, segundo Leme Júnior e Borges (1965) (DELGADO; CÉSAR, 1977)

Elemento	Porcentagem
Água	74,5
açúcares	14
sacarose	12,5
glicose	0,9
frutose	0,6
Fibras	10
Cinzas	0,5
matéria nitrogenada	0,4
gorduras e ceras	0,2
substâncias pécicas e gomas	0,2
ácidos combinados	0,12
ácidos livres	0,08
matéria corante	não dosado

Tabela 2 - Concentração dos principais solutos presentes na solução do apoplasto e simplasto dos internós do colmo de cana numerados(2, 10, 20, 30 e 40) a partir do topo em direção a base. Os valores em parênteses representam a porcentagem do total de solutos. Dados não publicados de Welbaum e Meinzer (1990) (MOORE, 1995)

Solutos	Concentração (mmol L ⁻¹) no internó de número:				
	2	10	20	30	40
Simplasto					
Sacarose	110 (26)	539 (68)	652 (73)	668 (75)	616 (72)
Frutose	55 (13)	11 (1)	2 (<1)	4 (<1)	2 (<1)
Glicose	62 (15)	7 (1)	0	1 (<1)	0
K ⁺	71 (17)	56 (7)	50 (6)	54 (6)	58 (7)
Ácidos orgânicos	135 (32)	16 (2)	-	-	25 (3)
Não identificados	0	163 (21)	188 (21)	159 (18)	155 (18)
Total	417 (100)	792 (100)	892 (100)	886 (100)	856 (100)
Apoplasto					
Sacarose	102 (29)	428 (68)	490 (70)	548 (76)	497 (68)
Frutose	43 (12)	11 (2)	2 (<1)	4 (1)	4 (1)
Glicose	40 (11)	7 (1)	-	-	-
K ⁺	72 (20)	63 (10)	54 (5)	53 (7)	58 (8)
Ácidos orgânicos	120 (34)	39 (6)	-	-	35 (5)
Não identificados	0	81 (13)	159 (23)	117 (16)	135 (18)
Total	325 (100)	629 (100)	705 (100)	722 (100)	726 (100)

2.3 Rota física do descarregamento do floema no parênquima do colmo de cana-de-açúcar

A compreensão da rota de movimentação da sacarose do floema até os vacúolos das células do parênquima do colmo de cana, compreendidos como destino final, é parte integral do estudo de controle e estocagem dos açúcares no colmo da cana-de-açúcar (PATRICK, 1990). As propriedades biofísicas do tecido de armazenamento são importantes para determinar a capacidade de estocagem e seus mecanismos de funcionamento. Na maturidade, a concentração de sacarose no colmo poderia gerar pressão de turgor alta se os açúcares fossem completamente retidos no citossol. Medidas de turgor aplicadas às células do parênquima do colmo de cana como extensibilidade da parede celular e condutividade da membrana plasmática indicam que a pressão de turgor é mantida baixa graças à partição dos solutos que ocorrem entre os compartimentos do simplasto e do apoplasto (MOORE; COSGROVE, 1991).

Figura 2 - Secção transversal do internó número 4 do colmo de cana-de-açúcar. A. Feixe vascular corado com sulfato de berberina para a localização de lignina e suberina. As setas indicam locais onde ocorre camada única das células da bainha vascular. B. Parênquima de estocagem. Adaptado de Walsh et al. (2005)

Cerca de 50% dos feixes vasculares presentes nos internós do colmo de cana estão localizados nos primeiros 3 mm da região mais externa do parênquima do colmo,

sendo que tais feixes são incapazes de transportar a sacarose a longas distâncias. Em torno dos feixes vasculares há uma bainha composta de fibras (esclerênquima) que isola completamente o apoplasto do floema do restante do parênquima de armazenamento (WALSH et al., 2005). A presença destes dois espaços apoplásticos definidos e completamente separados, um espaço apoplástico presente no feixe vascular e outro no parênquima do colmo, foram claramente demonstrados por meio de testes com corante em ambas as localidades. O corante aplicado no espaço apoplástico do feixe não cruzou a bainha do feixe, ficando confinado, e vice-versa, o teste realizado com o corante no espaço apoplástico do parênquima do colmo não indicou a presença de conexão com o apoplasto dos feixes vasculares (KOMOR, 2000). Por outro lado, os feixes vasculares associados ao transporte da sacarose a longa distância, localizados preferencialmente na região central do tecido do internó, possuem uma bainha de fibras que apresentam regiões com uma única camada de célula e é justamente nestas regiões mais delgadas onde estão presentes as células adjacentes com presença de campos de pontuações na parede celular secundária (Figura 2A). Os plasmodesmatas, arranjados em placas de pontuações, observados em todas as interfaces floema-parênquima, ligam as células da fibra dos feixes vasculares às células adjacentes do parênquima de estocagem através de pontuações com mais de 1 μm de diâmetro (WALSH et al., 2005).

Outro fato importante que ocorre no tecido de estocagem dos internós do colmo da cana é o processo de lignificação que as células do parênquima do colmo sofrem durante a maturação do internó. O processo de lignificação começa nas células adjacentes ao feixe vascular (menos de 5% das células do tecido de estocagem são lignificadas nos internós imaturos) e avança no sentido centrífugo com o passar do tempo (mais de 60% das células são lignificadas nos internós maduros). Por outro lado, certas células nunca sofrem lignificação. Estas células não lignificadas realizam o transporte da sacarose entre o simplasto e o apoplasto celular (WALSH et al., 2005). A sacarose pode se movimentar simplásticamente a partir do floema, atravessando a bainha de fibras, passando pelas placas de pontuações (plasmodesmatas) e alcançando as células do parênquima de estocagem. Os internós em processo de maturação e os internós já maduros utilizam a rota simplástica para o descarregamento

da sacarose. A força motriz para a transferência simplástica da sacarose presente no floema dos feixes vasculares até o parênquima de armazenamento obedece a um gradiente de difusão, auxiliado pela pressão hidrostática gerada pelo floema, de modo que ambos os fatores podem operar na cana-de-açúcar (KOMOR, 2000). O fluxo máximo de sacarose medido através dos plasmodesmatas das células de fibra foi estimado em $3,9 \times 10^5$ picomol.cm⁻².plasmodesmata.s⁻¹, taxa considerada baixa quando avaliada isoladamente. Porém, considerando-se que o fluxo de transferência de sacarose ocorre por toda a bainha dos feixes vasculares difundida no parênquima do colmo, a magnitude absoluta deste valor encontra-se alta (WALSH et al., 2005).

Outro artefato importante para a manutenção do gradiente do fluxo de sacarose é a exportação deste carboidrato do *continuum* simplástico para o espaço apoplástico (RAE et al., 2005). O refluxo da sacarose concentrada no espaço apoplástico para o sistema vascular é evitada justamente pela predominância da natureza hidrofóbica da parede celular lignificada e/ou suberizada das células que cercam os feixes vasculares, formando um compartimento apoplástico isolado (JACOBSEN et al., 1992).

2.4 O armazenamento da sacarose no colmo da cana-de-açúcar

A síntese de sacarose e sua acumulação em plantas superiores é o resultado do produto de uma extensa rede de interações. As taxas de acumulação da sacarose nas variedades de cana flutuam numa ampla faixa de concentração, conforme o genótipo da planta, o estágio de desenvolvimento e o ambiente ao qual as plantas estão submetidas. As plantas percebem e respondem ao ambiente por meio de uma complexa rede de percepção e transdução da informação, resultando numa série de ações coordenadas, que inclui a acumulação da sacarose (MOORE, 2005).

Ao invés de ser armazenada como um produto final inerte, a sacarose é metabolicamente ciclada no parênquima do colmo da cana (KOMOR et al., 2000). A importância fundamental da natureza dinâmica no processo de armazenamento da sacarose, são as enzimas que clivam esse carboidrato no tecido do colmo (GROP; CAMPBELL, 2001). Quando é descarregada nas células de armazenamento, a

sacarose é metabolizada por diferentes enzimas que realizam as mesmas reações ou reações similares, as quais podem operar em paralelo. As enzimas simplásticas envolvidas diretamente na síntese da sacarose são; sacarose fosfato sintase, sacarose fosfatase e a sacarose sintase. Por outro lado, as enzimas que participam da quebra da sacarose são; a invertase ácida solúvel, a invertase neutra e a sacarose sintase (KOMOR, 2000). O chamado “ciclo fútil” (*futile cycle*) da sacarose, Figura 3, a constante clivagem e re-síntese da molécula têm sido proposta como o mecanismo que permite maior flexibilidade e controle sobre o metabolismo de carboidrato e sua partição. Esta ciclagem promove o descarregamento da sacarose do floema para o parênquima do colmo através da implantação de um gradiente de concentração (NGUYEN-QUOC; FOYER, 2001; RONTEIN et al., 2002).

Figura 3 - Esquema das reações do modelo de acúmulo de sacarose em colmo de cana-de-açúcar. Os metabólitos são representados pelos retângulos ou círculos em cinza claro. As enzimas são representadas pelos retângulos em branco. O valor 2 representa o coeficiente de estequiometria. Abreviações das enzimas - HK: hexoquinase; FRK: frutoquinase; UDPGDH: UDP-glicose desidrogenase; PFK: fosfofrutoquinase; PFP: fosfofrutoquinase dependente de pirofosfato; NI: invertase neutra; SuSy: sacarose sintase; ALD: aldolase; SPS: sacarose fosfato sintase; SPase: sacarose fosfatase; VAC: transportador de sacarose vacuolar. Metabólitos - Glc: glicose; Fru: frutose; Suc: sacarose; S6P: sacarose 6-fosfato; HexP: hexose fosfato; FbP: frutose 1,6-bisfosfato; UDPGA: UDP-ácido glucurônico; TrP: triose fosfato (UYS et al., 2007)

2.5 Enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose

2.5.1 Sacarose fosfato sintase (SPS) (EC 2.4.1.14)

A SPS é uma enzima solúvel no citossol de baixa abundância (<0,1% das proteínas solúveis das folhas), que catalisa livremente a reação reversível: UDP-glicose + frutose 6-fosfato $\xleftrightarrow{\text{SPS}}$ sacarose 6-fosfato + UDP + H⁺. No entanto, a instantânea remoção do fosfato da molécula de sacarose 6-P pela ação da enzima sacarose fosfato fosfatase (SPP; EC 3.1.3.24), mantém a concentração de sacarose-P baixa, deslocando o equilíbrio da reação para a direita, dando um caráter irreversível a reação da SPS (HUBER; HUBER, 1996). A enzima SPS é regulada basicamente por três mecanismos distintos, o primeiro, mais abrangente, envolve o controle da expressão gênica; o segundo através do controle alostérico da enzima, realizado pela glicose 6-fosfato (ativador) e o terceiro e último mecanismo, ocorre através de modificações covalentes da proteína via fosforilação reversível (HUBER; HUBER, 1996).

Muitos estudos de relativa importância agrônômica conduzidos com espécies de gramíneas (Poaceae) têm atrelado o crescimento e a produtividade à atividade da SPS. Em estudos comparativos envolvendo vários genótipos de milho a atividade da enzima SPS mostrou-se positivamente correlacionada à taxa de crescimento das plantas. A atividade da SPS também foi correlacionada à produtividade de grãos em diferentes linhagens de milho, apresentando uma forte marca fenotípica (BERTIN; GALLAIS, 2001). Em arroz, estudos mostraram a correlação da atividade da SPS à taxa de expansão foliar (SENEWEERA et al., 1995) e mais recentemente, um QTL ligado à altura das plantas de arroz mostrou forte correlação com o gene *OsSPS1* (ISHIMARU et al., 2003). Já em cana-de-açúcar a acumulação de sacarose é dependente da atividade da SPS (ZHU et al., 1997). Porém, muitos destes estudos realizados são correlacionados positivamente para a atividade da SPS e acúmulo de sacarose, mas ainda não provam concretamente que a atividade da enzima SPS é um fator de controle do crescimento e produtividade da cana (CASTLEDEN et al., 2004).

A expressão do gene da SPS responde aos teores de açúcares do meio. O tratamento de folhas de beterraba com solução de glicose promoveu aumento

acentuado no nível de expressão do mRNA da SPS, ao passo que o provimento dessas folhas com uma solução de sacarose induziu uma ligeira diminuição no nível de expressão do mRNA do gene da SPS (HESSE et al., 1995).

Baseado em resultados obtidos por análise da atividade enzimática e quantidade de açúcar em várias progênies de cana-de-açúcar, Botha e Black (2000) concluíram que o conteúdo de sacarose está fortemente correlacionado à intensa atividade da SPS e da invertase ácida solúvel, propondo que o acúmulo de sacarose só é possível quando a atividade da SPS excede a atividade da invertase ácida solúvel. Porém, a diminuição da atividade da invertase ácida solúvel nem sempre é evidenciada durante o processo de acúmulo de sacarose (EBRAHIM et al., 1999), tornando incerta esta proposição.

2.5.2 Sacarose sintase (SUSY) (EC 2.4.1.13)

A atividade da enzima SUSY tem sido identificada em todos os tecidos da cana-de-açúcar, com pH ótimo entre 7,0 e 7,5 (BUCZYNSKI et al., 1993; SCHAFER et al., 2004). A SUSY catalisa a reação reversível: sacarose + UDP $\xleftrightarrow{\text{SUSY}}$ frutose + UDP-glicose. A atividade catalítica *in vivo* da enzima, entretanto, depende da concentração de sacarose no interior da célula e da taxa com que a UDP-glicose e frutose são utilizadas, além da taxa de reciclagem do UDP.

Em muitas espécies, a atividade da SUSY está associada ao crescimento e à força de dreno (SUNG et al., 1989), ao tecido vascular, mais especificamente ao floema (SCHAFER et al., 2004), e à preservação da ativação da molécula de glicose, através da ativação do motivo de hexose pela molécula de UDP (HUBER; AKAZAWA, 1986).

Isoformas da SUSY associadas à membrana plasmática evidenciam seu envolvimento na biossíntese de celulose e calose (AMOR et al., 1995). Plantas transformadas de algodão com anti-senso do gene da SUSY mostraram que as longas fibras de celulose na semente não se formam quando a atividade da SUSY está significativamente reduzida e que os efeitos se estendem da epiderme, passando pelo

endosperma e afetando o desenvolvimento do embrião (RUAN et al., 2003). Em milho, foram descobertos três genes não-alélicos para a SUSY (McCORMICK et al., 1982) e, em arroz, no mínimo três genes de SUSY apresentaram diferenças na expressão entre diferentes tecidos estudados (WANG et al., 1999). No colmo de cana-de-açúcar, pesquisas mais recentes, apontam no mínimo três isoformas distintas da SUSY, com possíveis envolvimento fisiológicos diferentes (SCHAFER et al., 2005). Regiões específicas das sequências de aminoácido das isoformas da SUSY apresentam alto grau de conservação entre muitas espécies, como por exemplo arroz, milho, trigo e batata (WANG et al., 1992).

A alta atividade da SUSY está presente nos tecidos dreno de cana-de-açúcar, como por exemplo nas folhas em formação e nos internós do colmo. A taxa máxima de clivagem da sacarose foi encontrada em internós maduros, com atividade crescente na direção do topo para a base (internó 3 para o internó 9), sugerindo uma correlação positiva entre a hidrólise da sacarose, atividade da SUSY e conteúdo total de sacarose (SCHAFER et al., 2004). Em cana-de-açúcar, também tem-se correlacionado a atividade da SUSY com a formação de UDP-glicose a partir da sacarose na formação da parede celular, resultando no alongamento do internó (BUCZYNSKI et al., 1993). Uma particularidade do gene da SUSY é que ele é superexpresso em condições de baixa concentração do oxigênio. Sob condições pronunciadas de hipoxia, o gene da SUSY responde rapidamente ao aumento da concentração de Ca^{2+} citossólico, um mensageiro secundário, resultando na biossíntese de celulose e calose (KOCH, 2000).

2.5.3 Invertases (IN) (EC 3.2.1.26)

As invertases das plantas (β -frutofuranosidase) compreendem uma família de enzimas as quais catalisam a hidrólise da sacarose em uma reação irreversível: sacarose + H_2O $\rightarrow$ glicose + frutose. As plantas superiores contêm algumas isoformas da enzima invertase e que podem ser diferenciadas através da localização (parede celular, vacúolo e citossol), através da solubilidade (solúvel ou insolúvel) e pH ótimo (ácido ou neutro/alcalino). Dessa maneira, convencionou-se em três as principais

isoformas: a invertase ácida ligada à parede celular - CWIN (pH ótimo 4,0-4,5; insolúvel; glicosilada), a invertase ácida vacuolar - ACIN (pH ótimo 4,0-4,5; solúvel; glicosilada) e a invertase citossólica - NTIN (pH ótimo 7,0-7,8; solúvel; não-glicosilada) (STRUM; CHRISPEELS, 1990).

Figura 4 - Localizações sub-celulares das isoformas da invertase. SUC – sacarose; Glc – glicose; Fru – frutose; eST; ST – transportador de sacarose; HT – transportador de glicose; Inv-CW – invertase ácida ligada à parede celular; Inv-N – invertase neutra e Inv-V – invertase vacuolar. Adaptado de Roitsch e González (2004)

As funções fisiológicas das isoformas das invertases são complexas e dependem muito do tipo de tecido. A ACIN, por exemplo, mobiliza a sacarose, controlando a quantidade desse açúcar no interior do vacúolo e também exercendo importante papel no estabelecimento da força de dreno em tecidos de estocagem (KLANN et al., 1993; SEBKOVÁ et al., 1995). Normalmente, a atividade da ACIN é alta em tecidos que estão em rápido crescimento, como regiões meristemáticas da parte aérea e das raízes, da mesma forma que em colmos imaturos. Primariamente, a ACIN atua no vacúolo das células do parênquima do colmo. Porém, a ACIN tem sido identificada no espaço apoplástico entre as células do colmo, em frações solúveis presentes no apoplasto ou então em frações ligadas à parede celular (GLASZIOU; GAYLER, 1972; HAWKER et

al., 1991). Variedades pertencentes ao gênero *Saccharum* que eventualmente apresentam altos níveis da atividade da ACIN nos internós maduros não acumulam altos teores de sacarose. Da mesma forma, durante o processo de amadurecimento dos internós, a atividade da ACIN diminui mais de duas ordens de magnitude, tornando esta enzima não a principal no processo de acúmulo de sacarose em cana, mas um dos fatores que auxiliam no processo (ZHU et al., 1997). A expressão da ACIN é modulada por uma série de sinais, que incluem os próprios açúcares solúveis da célula, além dos hormônios vegetais e estímulos ambientais (KOCH, 2004).

Em outra classe de invertases, ligadas à parede celular, CWIN, desempenham papel fundamental no processo de descarregamento do floema nos tecidos drenos. No espaço apoplástico, a CWIN assegura a criação de um gradiente de concentração entre a fonte e o dreno, justamente pela clivagem da sacarose em seus monômeros mais simples, glicose e frutose (WINTER; HUBER, 2000). Em muitas espécies, a CWIN está ligada a outros processos importantes como osmorregulação, crescimento de tecidos, percepção do ambiente externo e carregamento e descarregamento da sacarose no apoplasto (ALBERTSON et al., 2001). A CWIN é muito pouco caracterizada em cana-de-açúcar, sua dificuldade está justamente na distinção entre ACIN e CWIN devido às suas propriedades similares (VATTUONE et al., 1981). Outro problema que afeta enormemente a caracterização da CWIN é a dificuldade de isolá-la. Pelo fato da enzima estar ligada ionicamente à parede celular seu processo de remoção torna-se dificultado e requer altas concentrações de sais (ALBERTSON et al., 2001).

Evidentemente o ciclo de quebra e síntese da sacarose ocorre no citossol das células do parênquima do colmo da cana. A hidrólise da sacarose é processada constantemente pela NTIN, que exerce importante mecanismo de controle sobre a acumulação da sacarose e suas utilizações. A respeito dos estudos desenvolvidos com a NTIN em cana-de-açúcar, nenhum padrão de expressão da proteína ou o papel da enzima é evidente. Muitos estudos apontam para o aumento da atividade da NTIN conforme o internó vai maturando. Porém, por outro lado, outras investigações apontam para a diminuição da atividade da NTIN com o avanço da maturação dos internós da cana (BOSCH et al., 2004). Sabe-se que o principal papel da NTIN é a regulação da

concentração de sacarose no tecido do colmo, sendo a NTIN dentre as enzimas, uma das responsáveis em regular o movimento da sacarose dos tecidos vasculares até o parênquima de armazenamento dos internós maduros. A identificação de elevados níveis de atividade da NTIN nos tecidos do colmo dos internós maduros levou à hipótese de que a NTIN pode afetar o controle da expressão de genes que respondem à concentração de açúcares do meio, pelo fato dessa enzima controlar os teores de hexoses no citossol (SACHER; GLASZIOU, 1963). A atividade da NTIN é primariamente controlada pelas mudanças nos níveis de proteína, e ainda não se sabe se essa mudança é devido a um controle transcricional, traducional ou devido ao aumento do *turnover* da proteína (BOSCH et al., 2004).

2.5.4 Hexoquinase (HK) (EC 2.7.1.1)

Açúcares sinalizadores claramente desempenham papel importante no metabolismo celular e na expressão de muitos genes envolvidos no metabolismo de carboidratos. A HK possui a função metabólica de catalisar a conversão da glicose em glicose 6-fosfato, preferencialmente. Porém, eventualmente a HK pode fosforilar a frutose em frutose 6-fosfato. Nas plantas, a HK parece estar associada particularmente ao metabolismo fotossintético, regulando o *status* de carboidrato e o controle da expressão dos genes do aparelho fotossintético das folhas (HALFORD; PAUL, 2003). O conceito de que a hexose seja um açúcar sinalizador primário (o açúcar atua diretamente na modulação da atividade da enzima) ganhou o agrado da comunidade científica internacional. A ideia inicial foi testada em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, superexpressando e reprimindo o gene da HK. As plantas que superexpressavam o gene da HK foram mais sensíveis à glicose, enquanto as plantas transgênicas que tiveram o gene reprimido foram menos sensíveis, quando utilizados genes fotossintéticos como marcas de expressão para avaliar o fenótipo das plantas (HALFORD et al., 1999; JANG; SHEEN, 1994). Contudo, os mecanismos moleculares e bioquímicos da via de sinalização intermediada pela HK estão muito longe de serem desvendados. As informações mais concretas são as vias de sinalização que ocorrem nos procariotos. Em *E. coli*, o sistema da fosfotransferase consiste de muitas proteínas

fosforil-transferase e uma proteína transmembrana transportadora de açúcar (permease), que catalisa tanto o transporte do açúcar através da membrana como também realiza a sua fosforilação (JANG; SHEEN, 1994). O objetivo principal de correlacionar a ação das HK na geração de açúcares fosforilados sinalizadores em plantas de cana é pelo fato dessas plantas acumularem grandes quantidades de hexoses, principalmente glicose e frutose nas células de armazenamento do colmo. Durante a acumulação da sacarose há uma significativa ciclagem do carbono entre hexoses e a sacarose, a fim de manter baixas concentrações de açúcares redutores, ao custo da intensa atividade da HK (HOEPFNER et al., 2003).

2.5.5 Frutoquinase (FRK) (EC 2.7.1.4)

A fosforilação das hexoses livres não são apenas o ponto inicial da glicólise, mas também são necessárias para a mobilização das hexoses pela célula. A FRK realiza a fosforilação especificamente da frutose através de uma reação irreversível, que pode ser considerada um importante ponto para a regulação no metabolismo de carboidratos. Como açúcar sinalizador a frutose foi primeiramente estudada em mutantes de *Arabidopsis* transformados com o gene *frk2*, resultando na perda da insensibilidade ao açúcar, ou seja, houve a restauração do caráter fenotípico normal (HOEPFNER et al., 2004). Em poucas espécies o gene da FRK tem sido clonado, e dentre as mais diferentes espécies estudadas como tubérculos de batata (FRK2), beterraba (FRK1 e FRK2), cana-de-açúcar (FRK1 e FRK2) e *Arabidopsis* (FRK1, FRK2 e FRK3), de um a três genes da FRK foram identificados. Na última década, pesquisas apontam que a isoforma FRK1 é constitutivamente expressa em todo o corpo das plantas de tomate e que a isoforma FRK2 é específica para tecidos dreno e apresenta baixos níveis de expressão em folhas. Já em plantas de batata, a atividade da isoforma FRK1 é alta nas folhas e baixa nos tubérculos, enquanto a isoforma FRK2 apresenta quase que a totalidade da atividade das FRK nos tubérculos. Muitos destes resultados indicam a especificidade da FRK2 aos tecidos dreno (PEGO; SMEEKENS; 2000). O papel das FRK's em cana-de-açúcar ainda é muito pouco compreendido. Nos internós em formação e imaturos de cana, acredita-se que a função básica das FRK's seja a

regulação do metabolismo global e que nos internós maduros a sua função principal esteja toda voltada para a acumulação de sacarose. A isoforma FRK2 em cana é regulada principalmente pela inibição do substrato frutose, promovendo um ponto de controle sobre a fosforilação da frutose (HOEPFNER et al., 2003).

2.6 Desenvolvimento de ferramentas para elucidação dos principais pontos de controle da acumulação da sacarose em colmo de cana-de-açúcar

As técnicas moleculares amplamente difundidas para manipular as rotas metabólicas em dicotiledônea C3, como superexpressão ou repressão gênica, estão sendo prontamente aplicadas à cana-de-açúcar. A primeira transformação bem sucedida de *callus* embriogênico de cana foi realizada utilizando-se a técnica de biobalística por Bower e Birch em 1992. Desde então, outras estratégias alternativas foram testadas, desde a técnica de eletroporação à transformação via *Agrobacterium*. Com o apoio e financiamento dos projetos genoma difundidos pelo mundo todo no início dos anos 2000, todos os avanços na compreensão dos genes permitiram ganhos qualitativos e quantitativos nas técnicas de transformação. Poucas pesquisas no mundo têm sido realizadas especificamente para um produto gênico ou organela em cana. Para se obter sucesso na manipulação molecular voltada para a acumulação da sacarose em colmos de cana, por exemplo, há que se focar em pelo menos três alvos específicos: o primeiro é a manipulação do processo de síntese de sacarose, aumentando os teores produzidos nas folhas e nos colmos; o segundo é o aumento da atividade dos transportadores de sacarose movidos a prótons e, em terceiro lugar, é a diminuição da expressão ou da atividade enzimática da invertase ácida, diminuindo a hidrólise da sacarose nos vacúolos das células do parênquima do colmo (GROF; CAMPBELL, 2001).

Com o objetivo de elucidar as principais funções das diferentes isoformas das invertases no processo de acúmulo da sacarose em cana-de-açúcar, experimentos pautados na utilização da tecnologia anti-sense para reprimir seus genes começaram a ser empregados. Fragmentos dos genes de diferentes isoformas das invertases da

cana apresentam alta homologia com os fragmentos dos genes das invertases de milho (ALBERT et al., 1996). Algumas observações podem ser inferidas baseando-se em estudos de mutantes de milho que apresentam alguns desses genes nocauteados (GROF; CAMPBELL, 2001). O aspecto fundamental na dinâmica natural do processo de acúmulo de açúcar é a ação das enzimas que clivam a sacarose no colmo da cana. A sacarose é hidrolisada por três diferentes isoformas de invertase.

Alterações fisiológicas decorrentes da mudança da razão sacarose:hexose foram observadas em plantas de tomate, através da repressão do gene da ACIN. Utilizando-se a construção gênica anti-sense do gene da enzima da ACIN sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S observou-se que os fenótipos das plantas transgênicas não se diferenciavam dos fenótipos das plantas controle, porém os frutos dos transgenes apresentaram redução significativa do tamanho, corroborando com o papel fundamental desta enzima, que é de estabelecer a força de dreno e promover o desenvolvimento (OHYAMA et al., 1995; KLANN et al., 1996).

O papel da SUSY é mais complexo no desvendamento dos pontos de controle do acúmulo da sacarose porque esta enzima opera tanto no sentido de clivagem da sacarose como também promove a síntese desse açúcar. Em milho, duas isoformas da SUSY foram identificadas, codificadas por dois genes não alélicos (CHOUREY, 1981). Utilizando anticorpos monoclonais, ou quais reconhecem especificamente uma isoforma e não para outra (SUSY1 ou SUSY2), foi identificada a presença da SUSY1 em todos os tecidos das plantas avaliadas, enquanto a SUSY2 não estava presente nas folhas e internós maduros do colmo das plantas do milho (BUCZYNSKI et al., 1993). A atividade da SUSY em cana tem sido amplamente relacionada ao descarregamento da sacarose no tecido do colmo e ao suprimento de UDP-glicose para a síntese da parede celular. Alguns autores relataram que a função de síntese da sacarose pela SUSY diminui à medida que ocorre o amadurecimento do colmo (BOTHA; BLACK, 2000), enquanto outros grupos relataram que a atividade da SUSY aumenta no sentido do topo para a base, encontrando seu ápice no internó 14 (BUCZYNSKI et al., 1993).

Embora muitas questões ainda permaneçam, poucos passos na rota de transporte da sacarose no parênquima do colmo da cana puderam ser definidos. As

técnicas mais amplamente empregadas para a compreensão deste processo, são técnicas como microarranjo e bibliotecas de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) (RAE et al., 2005). A sacarose é exportada dos feixes vasculares para as células adjacentes à bainha vascular via simplasto. Nestas células, a sacarose pode passar para o meio apoplástico ou então seguir via simplasto até os locais de estocagem. Os transportadores que controlam o movimento transmembrana da sacarose são empregados na regulação osmótica. Em colmos maduros de cana, os transcritos superexpressos são homólogos aos transportadores do tipo antiporte Na^+/H^+ . O movimento da água nesse tecido, também é regulado pela atividade de transportadores do tipo aquaporinas ou canais de água, genes estes identificados através das análises de coleção de cDNA (CASU et al., 2004).

A transferência dos solutos entre os espaços apoplástico e simplástico é controlada por proteínas carreadoras transmembrana. Estas proteínas muitas vezes são consideradas “gargalos” da rota de transporte e tem sido manipuladas geneticamente com frequência (KUNZE et al., 2002). Os genes codificadores de proteínas transportadoras foram identificados numa coleção de cDNA extraídas do tecido do colmo maduro de cana. As técnicas mais empregadas para inferir sobre as funções dos transportadores localizados no parênquima do colmo da cana são a imunohistoquímica e a hibridização *in situ* utilizando-se de transcritos correspondentes aos genes das proteínas transportadoras (CASU et al., 2003).

2.7 Biologia molecular aplicada à cana-de-açúcar

2.7.1 A cana-de-açúcar e o projeto SUCEST

O conhecimento dos mecanismos de regulação gênica relacionados direta ou indiretamente a um traço fenotípico de interesse num programa de melhoramento, são informações indispensáveis para o sucesso no desenvolvimento de novas cultivares. No processo de acumulação de açúcar pela cana por exemplo, é muito importante entender o impacto do estresse causado pelo ambiente na cultura, bem como quais os

papéis desempenhados pelos hormônios vegetais na sinalização integrada e quais serão seus impactos no desenvolvimento do vegetal (PAPINI-TERZI et al., 2009).

O desenvolvimento das técnicas chamadas *highthroughput* empregadas nos projetos genoma disponibilizam uma vasta quantidade de dados informativos com relação ao organismo sequenciado. O maior e mais notável projeto de EST de cana-de-açúcar (SUCEST) foi um programa brasileiro do consórcio ONSA (*Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis*) que gerou cerca de 240.000 ESTs de 26 bibliotecas de cDNA de cana de diferentes tecidos como meristema apical, flores, gemas vegetativas laterais, folhas maduras, raízes, casca do colmo, internós, sementes e cultura de *calli* em diferentes estádios (VETTORE et al., 2001). Os ESTs foram montados em 43.000 *clusters*, dos quais 38% não apresentaram alinhamento com sequências depositadas em banco de dados públicos. Cerca de 53% dos *clusters* foram formados por ESTs em mais de uma biblioteca, delimitando um grupo de genes os quais são coordenadamente expressos em diferentes tecidos, enquanto 47% foram formados por ESTs expressos em apenas uma única biblioteca, delimitando a expressão de genes tecido-específicos. Das 43.000 sequências anotadas, cerca de 50% eram relacionadas ao metabolismo de proteínas, comunicação celular/transdução de sinais, bioenergética e respostas ao estresse (VETTORE et al., 2003).

2.7.2 Regulação da expressão gênica em colmo de cana-de-açúcar

Estudos moleculares indicaram que os genes associados ao metabolismo da sacarose não são abundantemente expressos nos tecidos dos colmos de cana. Enquanto os genes relacionados à síntese e hidrólise da sacarose são “desligados” durante o processo de maturação, muitos genes indiretamente associados ao acúmulo da sacarose são regulados durante o desenvolvimento do tecido, e podem ser associados a resposta à seca ou então modulados por hormônios ou concentração de açúcares (PAPINI-TERZI et al., 2009).

A fosforilação das proteínas parece desempenhar papel predominante no processo de acúmulo de sacarose e desenvolvimento do colmo. Muitos destes genes

são regulados durante o desenvolvimento do colmo, de modo que a MAPK quinase foi vinculada ao processo de regulação e estabelecimento da relação fonte-dreno em cana (EHNESS et al., 1997; McCORMICK et al., 2008). A categoria de quinases de proteínas que sofre maior alteração é a família das quinases SNF-1 (*Sucrose Non Fermenting*). Em plantas, essa quinase foi renomeada como SnRK1 (SANDERS et al., 2002). Outros membros das sub-famílias da SnRK incluem os OSA-PK (*Osmotic Stress Activade Protein Kinase*) e CIPK (resposta aos sinais do cálcio), ligados ao processo de maturação do colmo (BOUDSOCQ; LAURIERE, 2005).

Sabe-se que para a planta de cana entrar no processo de maturação é desejável que a cultura seja exposta a um período de ausência ou mesmo baixo índice de precipitação. É possível que o aumento da concentração de sacarose seja dependente de estiagem, por isso, os sinais gerados pelo estresse hídrico podem atuar como osmoprotetores, principalmente as moléculas de frutose, rafinose e trehalose (PAPINI-TERZI et al., 2009). A resposta da planta à seca depende da duração e da intensidade desse estímulo. Com isso, o estresse gerado pela seca ativa alguns sensores de cálcio, espécies reativas de oxigênio e fatores de transcrição como o DREB e NAC (HU et al., 2006).

Outros candidatos relacionados ao processo de desenvolvimento e acúmulo de sacarose nos colmos são os fatores de transcrição (FT). Dentre estes FT relacionados ao acúmulo de sacarose em colmos maduros foram identificados os ARF6 (*Auxin Response Factor*), NAM (*No Apical Meristem*) e EIL (*Ethylene Insensitive*).

E, por fim, os genes responsivos aos teores de açúcares também desempenham papel fundamental nos colmos da cana. Muitos destes genes são relacionados ao processo de transdução de sinal, como as quinases, fosfatases, FT e hormônios, que na sua constituição apresentam sítios específicos regulados por açúcares. Os mecanismos de como esses genes influenciam na regulação da acumulação da sacarose em cana, ainda necessitam ser melhor compreendidos (PAPINI-TERZI et al., 2009).

Decorrente da grande importância comercial da cana-de-açúcar, além do Brasil, muitos outros países perceberam a importância de desenvolver métodos para a descoberta de novos genes de interesse agrônomo. É nesta linha que Austrália e África do Sul estabeleceram um pequeno programa independente de ESTs de cana. O chamado programa ICSB (*International Consortium of Sugarcane Biotechnology*) analisou apenas três bibliotecas (meristema; folhas maduras e internós maduros), com 9.216 ESTs arranjados em 3.400 sequências não redundantes (MA et al., 2004). Para os ESTs obtidos das diferentes bibliotecas de cDNA, genes associados à síntese e modificação de proteínas foram os mais representados, incluindo-se diferentes proteínas ribossomais, fatores de iniciação de tradução e fatores de alongamento. Dentre os genes relacionados às modificações das proteínas, estão presentes aqueles envolvidos na rota de ubiquitinação, quinase e fosfatase de proteínas. Para a grande maioria dos ESTs identificados, estes puderam ser agrupados em quatro grandes categorias: metabolismo de carboidratos, metabolismo da parede celular, regulação/transdução de sinais e resposta ao estresse (CARSON; BOTHA, 2002).

2.8 Proteômica

A proteômica visa caracterizar o conjunto de proteínas expressas num dado momento em um tecido, fluido, célula ou organela, e, como qualquer metodologia, deve ser considerada parte integrante de um regime multidisciplinar. As análises devem envolver os dados gerados pelas técnicas denominadas de “ômicas” (Genômica, Transcritômica, Proteômica e Metabolômica), bem como informações provenientes da bioquímica clássica, da fisiologia e da biologia celular, compondo uma rede de análise coesa (JORRÍN-NOVO et al., 2009). O perfil protéico é uma informação muito útil para a validação da estrutura e da expressão gênica (BAGINSKY, 2008), mesmo ainda que permaneçam dúvidas em relação ao número de proteínas que um gene pode traduzir, resultado do *splicing* alternativo ou de alterações pós-traducionais. Cada vez mais a proteômica tem se firmado como uma ferramenta poderosa dentro dos programas de melhoramento genético, pois, diferente do que ocorre quando são utilizados marcadores fenotípicos ou baseados em DNA, a proteômica fornece informações em

nível molecular da variabilidade genética que é efetivamente expressa pelo genoma (PENNINGTON; DUNN, 2001).

Muitas técnicas podem ser empregadas para separar uma mistura complexa de proteínas, de modo que a separação por géis bi-dimensionais (2D-PAGE) é predominante. As principais críticas à essa técnica são a baixa precisão e a razoável reprodutibilidade. Porém, mesmo com algumas limitações, muitos investimentos têm sido realizados para aprimorar, por exemplo, a separação de proteínas hidrofóbicas, tecnologias de coloração de géis, captura e análise de imagens e robotização do processo baseado em 2D-PAGE (JORRÍN-NOVO et al., 2009). A tecnologia 2D-PAGE associada à espectrometria de massas tem sido a principal estratégia empregada pelos grupos de pesquisa (JORRÍN et al., 2007). A grande maioria dos estudos de proteômica em plantas são voltados para os perfis protéicos de vários órgãos, tecidos, células e organelas das principais culturas cultivadas (FUKUDA et al., 2003; SHEN et al., 2002).

As análises do proteoma de cana-de-açúcar ainda são muito pouco compreendidas. Os tecidos que compõem a planta de cana são materiais problemáticos do ponto de vista molecular, pois são tecidos que apresentam altos teores de fibras, altas concentrações de enzimas oxidativas, muitos compostos fenólicos e altas concentrações de carboidratos (especialmente a sacarose). Muitos dos artigos públicos envolvendo cana-de-açúcar enfatizam a extração de proteínas de folha simplesmente pela sua facilidade de coleta e extração, além de ser o tecido mais amplamente explorado. Até o momento, o trabalho publicado por Amaraj e colaboradores (2011) provavelmente é o único disponível na literatura que apresenta dados do proteoma do colmo da cana-de-açúcar. Neste mesmo trabalho, os autores focam sua investigação na comparação de algumas metodologias de extração de proteínas da folha e do colmo de cana, incluindo as extrações com ácido tricloroacético e fenol. De acordo com os resultados obtidos, a extração das proteínas com fenol apresentou melhor resultado, recuperando maior quantidade de proteínas na faixa de pH 5-7 (AMARAJ et al., 2011).

Um dos poucos trabalhos comparativos entre perfis protéicos compara proteínas de folha de cultivares resistente e suscetível de cana ao estresse hídrico objetiva a busca de um marcador fenotípico. Dados de espectrometria de massas e comparações

de sequências depositadas em banco de dados revelaram que a proteína p18 (proteína de 18 kDa) está positivamente relacionada à expressão da clorofila e da superóxido dismutase (SOD), apresentando a p18 como uma possível candidata para marca fenotípica em plantas de cana tolerantes à seca (JANGPROMMA et al., 2010).

Tendências de avanço da técnica proteômica têm apontado a técnica de MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*) como sendo a técnica que permite analisar um número grande de amostras num menor período de tempo com a mínima manipulação possível. Basicamente são empregadas duas colunas de cromatografia de princípios diferentes, uma de troca iônica e outra de hidrofobicidade. A técnica de MudPIT requer que todas as proteínas extraídas sejam digeridas e diretamente aplicadas em um sistema de separação (HPLC) e então analisadas por espectrometria de massas (LEE; COOPER, 2006).

No entanto, apenas a geração de dados proteômicos não resolve por si só a complexidade dos sistemas biológicos. É necessária a integração de dados oriundos da proteômica, genômica, transcritômica e metabolômica, o que não é uma tarefa trivial. A combinação desses dados requer parâmetros normalizadores, controle experimental rígido e uma visão holística para associar resultados estatísticos aos mecanismos moleculares da atividade celular.

3 OBJETIVOS

A rota da acumulação da sacarose em cana-de-açúcar foi estudada extensivamente através da ótica da fisiologia e da bioquímica (MOORE, 1995). Contudo, a análise da expressão dos transcritos das diferentes enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose em diferentes estádios de desenvolvimento, tem sido muito pouco explorada em relação aos genes e às enzimas que participam do processo (VERMA et al., 2011).

Dessa forma, o objetivo geral do trabalho é avaliar quais os principais genes e proteínas envolvidas no processo de acumulação da sacarose no colmo de cana, além do comportamento metabólico das células do parênquima relacionadas à estocagem sacarose. Como objetivos específicos o trabalho visou:

- Quantificar os principais açúcares solúveis, glicose, frutose e sacarose, presente nas células do parênquima do colmo dos internós do topo (I4) até os internós da base (I9), e estabelecer uma relação entre a concentração desses açúcares e as variações na expressão dos transcritos das enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo da sacarose;
- Acompanhar a evolução do perfil dos transcritos dos genes relacionados diretamente à rota da sacarose nos internós imaturos (I5) e maduros (I9) em plantas de cana em diferentes estádios de desenvolvimento, 4 meses, 7 meses e 10 meses;
- Avaliar a participação dos transcritos dos genes das enzimas do processo de ciclagem e acumulação de sacarose em internós desenvolvidos (I9) nas idades de 7 e 10 meses, para diferentes concentrações de sacarose;
- Identificação das proteínas diferencialmente expressas no internó 9 das plantas com 7 meses quando comparadas com o internó 9 das plantas de 10 meses. Identificar as proteínas preferencialmente expressas no internó 9 das plantas de 7 e 10 meses.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalação do experimento em casa de vegetação

Para a instalação do experimento em casa de vegetação foram utilizadas mudas de cana-de-açúcar com 30 dias após germinação. As mudas da variedade SP80-3280 foram gentilmente cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), localizado no município de Piracicaba/SP. Primeiramente, as bandejas contendo as mudas de cana foram aclimatadas em casa de vegetação nas dependências do Departamento de Genética da ESALQ/USP por 7 dias. Decorrido este período, foram preparados vasos plásticos com capacidade para 110 L de volume, estes foram preenchidos com latossolo roxo. Em cada vaso foram transplantadas 3 mudas, de modo que foram montados 9 vasos, totalizando 27 plantas, em delineamento inteiramente casualizado. Os vasos foram igualmente irrigados uma vez ao dia, sendo adicionada solução nutritiva comercial (15-15-15) na concentração de 4g/L uma vez por semana. As plantas foram submetidas a fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro, com a temperatura ajustada a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, (Figura 5).

Figura 5 - Instalação do experimento em casa de vegetação, mudas de cana-de-açúcar com 30 dias após germinação. A - vaso de 110 L preenchido com latossolo. B - mudas de cana SP80-3280 transplantadas em triplicata em cada vaso. C - panorama geral do canteiro com as mudas de cana

4.2 Períodos definidos para as coletas

Os pontos de coleta foram definidos com base na fenologia da cana-de-açúcar proposto por Kuijper descrito por Benda (1969). Foram estabelecidos três períodos de

coleta da haste principal do colmo das plantas de cana. A primeira coleta aos 4 meses (fase de perfilhamento), a segunda aos 7 meses (fase de crescimento vegetativo) e a terceira aos 10 meses (fase de maturação). As coletas foram realizadas ao acaso mediante sorteio dos vasos, sendo três replicatas com três plantas cada, em cada idade de coleta, Figura 6. As plantas coletadas aos 4 e 7 meses não tiveram a irrigação dos vasos cortada. Para as plantas coletadas aos 10 meses, os vasos foram submetidos a um regime de déficit hídrico na finalidade de potencializar o processo de acúmulo de açúcar no colmo da cana.

Figura 6 - Plantas de cana-de-açúcar na casa de vegetação em três idades diferentes. A- 4 meses (4 m). B- 7 meses (7 m). C- 10 meses (10 m), sob estresse hídrico

4.2.1 Acompanhamento do acúmulo de açúcares no colmo de plantas de cana-de-açúcar

Para poder acompanhar o processo de acúmulo dos açúcares no colmo da cana, foi utilizado um refratômetro ótico portátil (*Rocker[®] refractometer*). As plantas mantidas em casa de vegetação ao completarem 300 dias (10 meses) tiveram a água de irrigação cortada. Nesse momento, iniciou-se o acompanhamento do teor de açúcares do colmo realizado aos 0, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dias sem irrigação (d.s.i.). Para cada ponto de leitura medida com o refratômetro, foram coletadas amostras do terço médio do colmo dos perfilhos de 4 plantas distintas para comporem as médias.

4.3 Coleta dos colmos de cana-de-açúcar para a avaliação do proteoma e transcritoma

Nos três períodos, 4 m, 7 m e 10 m, definidos para coleta descritos anteriormente pelo item 4.2, as plantas tiveram todas as folhas retiradas da haste principal, da qual foram retiradas amostras da região mediana dos internós 5 e 9, ordendos do topo em direção à base. A casca foi removida, as amostras guardadas em envelopes de alumínio e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C até o momento do uso.

4.4 Coleta dos colmos de cana-de-açúcar para a quantificação dos açúcares solúveis

As hastes principais desfolhadas de 4, 7 e 10 meses foram seccionadas nos internós 4, 5, 6, 7, 8 e 9. Em cada internó retirou-se amostras do terço médio, colocadas separadamente em envelopes de alumínio e imediatamente acondicionadas em gelo até o momento do uso, realizado no mesmo dia da coleta.

4.5 Extração das proteínas totais dos internós 5 e 9 de cana-de-açúcar

As proteínas totais dos internós 5 e 9 foram extraídas de acordo com a metodologia de Hurkman e Tanaka (1986), com algumas modificações. Para cada tempo de coleta, foram realizadas 3 extrações independentes com 3 plantas em cada extração para cada internó coletado. Dois gramas de material foram pulverizados em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido e homogeneizados com 15 mL de tampão de extração (ANEXO A) em tubos de centrífuga (40 mL) e mantidos sob agitação constante (70 r.p.m.) a 4°C. A este homogeneizado foram adicionados 15 mL de fenol saturado em Tris-HCl (pH 8,5), e os tubos foram novamente mantidos em agitação por 30 minutos a 4°C.

Os tubos foram centrifugados a 10.000 *g* por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante (fase orgânica) foi coletado e transferido para novos tubos contendo 15 mL de tampão de extração, os quais foram mantidos sob agitação e posteriormente centrifugados a 10.000 *g* por 30 minutos a 4°C, repetindo-se este processo por mais 2 vezes.

Na última lavagem, o fenol recuperado (fase superior) contendo as proteínas foi adicionado em novo tubo e a este adicionado 5 volumes de 0,1M de acetato de amônio dissolvido em metanol 100%. Os tubos foram mantidos *overnight* a -20°C para completa precipitação das proteínas. No dia posterior, os tubos foram centrifugados a 16.000 *g* por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado recuperado foi lavado sob centrifugação a 16.000 *g* por 30 minutos a 4°C três vezes com 0,1M de acetato de amônio dissolvido em metanol 100%, uma vez com metanol 100% e uma vez com acetona 100%. Antes de cada centrifugação, os tubos permaneceram por 1 hora a -20°C. No final das lavagens, os tubos foram mantidos abertos em dissecador a 4°C até a secagem completa do *pellet* formado, por cerca de 48 horas.

4.5.1 Solubilização das proteínas totais

Após a secagem dos *pellets*, estes foram solubilizados em 800 µL de tampão de solubilização - TCT (ANEXO B). Para a solubilização completa das proteínas do *pellet*, os tubos foram submetidos a sonicação (42 Hz) intercalados com agitação vigorosa, antes do tampão ser recuperado e transferido para microtubo de 1,5 mL.

4.5.2 Quantificação das proteínas totais

As proteínas solúveis totais foram quantificadas utilizando-se o *kit BioRad Protein Assay* (BioRad), de acordo com o método de Bradford (1976). A reação para quantificação consiste em 1 mL do corante diluído em água deionizada (1:4), 795 µL de água deionizada e 5 µL do extrato de proteína. As leituras foram realizadas em triplicata por meio de espectrofotômetro a 595 nm. A curva padrão foi realizada com BSA (albumina sérica bovina) em tampão TCT.

4.6 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

A certificação da qualidade da proteína extraída das amostras foi feita mediante visualização em gel desnaturante de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970). Um total de 30 µg de proteína para todos os materiais foram utilizados para carregar o gel contendo concentrações distintas de acrilamida. Na primeira porção do gel, o *stacking*, a concentração utilizada de acrilamida é 4% (p/v) e a voltagem é mantida fixa a 40V. Na porção seguinte, o *running*, a concentração de acrilamida é 12,5% (p/v) e voltagem fixa a 80V (*Mini- PROTEAN II Cell, BioRad*). As alíquotas das amostras foram misturadas em microtubos de 0,2 mL com tampão desnaturante de corrida (ANEXO C) na proporção 1:1, aquecidos a 100°C por 60 segundos, para serem aplicadas no gel. Os tampões de corrida (ANEXO D) seguem as descrições segundo Laemmli (1970).

O gel foi mantido por 1 hora imerso em solução fixadora (ANEXO E) e posteriormente imerso na solução de coloração (ANEXO F) *overnight*. A coloração do gel foi realizada com *coomassie brilliant blue G-250 (BioRad)*. Todas as etapas foram realizadas sob agitação branda (40 r.p.m.).

4.7 Eletroforese bi-dimensional

A técnica de eletroforese bi-dimensional (O'FARREL, 1975) consiste de duas etapas distintas: na primeira dimensão, as proteínas são separadas pelos respectivos pontos isoelétricos e, posteriormente, na segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com seu peso molecular.

4.7.1 Focalização isoelétrica (IEF) – primeira dimensão

A IEF foi conduzida no sistema *Ettan IPGphor3 (GE Healthcare)*, a 20°C, utilizando fitas de gradiente imóvel de pH 4-7 linear (*Immobiline DryStrips, 18 cm, GE Healthcare*). Um total de 500 µg de proteínas das amostras foram adicionadas em tampão de focalização (ANEXO G) acrescido de 2% de anfólitos (pH 4-7) e as fitas

cobertas com óleo mineral próprio para a focalização. O programa de focalização foi montado de acordo com a Tabela 3. As fitas foram mantidas sob focalização até atingirem uma voltagem acumulada de 80.000 Vh.

Tabela 3 - Ajustes dos parâmetros do equipamento *Ettan IPGphor3* para focalização de fitas pH 4-7

Etapas	Voltagem (V)	Duração (horas)	Característica
reidratação	30	12	Constante
S1	100	1	Gradiente
S2	500	1	Gradiente
S3	1.000	1	Gradiente
S4	5.000	1	Gradiente
S5	8.000	1	Gradiente
S6	8.000	20	Constante

4.7.2 Eletroforese da segunda dimensão (2D-PAGE)

Para a eletroforese do gel de segunda dimensão, foi necessário realizar a redução e alquilação das fitas focalizadas anteriormente em tampão de focalização (ANEXO H). As fitas foram submetidas à redução com 2% DTT em tampão de focalização através da imersão na solução por 15 minutos. Decorrido este tempo, as fitas foram transferidas e imersas em nova solução de focalização contendo 4% de IAA e traços do corante bromofenol por mais 15 minutos.

O sistema de segunda dimensão foi montado no *PROTEAN II xi cells* (BioRad), com géis de poliacrilamida 12,5%, espessura de 0,75 mm e dimensões de 16 x 16 cm. As fitas já reduzidas e alquiladas foram acomodadas horizontalmente na parte superior do gel e posteriormente seladas com uma solução de agarose 0,5%. Em seguida, o sistema foi acoplado a banho-maria (4°C) circulante e adicionados os tampões superior e inferior de corrida Laemmli. A amperagem foi fixada a 30 mA por gel e a migração das proteínas foi realizada até alcançarem o limite inferior do gel.

O gel foi mantido por 1 hora imerso em solução fixadora (ANEXO E) e posteriormente imerso na solução de coloração (ANEXO F) *overnight*. A coloração do gel foi realizada com *coomassie brilliant blue G-250 (BioRad)*. Todas as etapas foram realizadas sob agitação branda (40 r.p.m.).

4.8 Análise e tratamento das imagens digitalizadas do gel

A digitalização das imagens dos géis foi feita com auxílio de um *scanner* modelo UTA-1100, através do programa *LabScan versão 5.0 (GE Healthcare)* e as imagens foram analisadas automaticamente pelo programa *Image Master 2D Platinum 7 software (GE Healthcare)*.

Todas as triplicatas de todos os tratamentos foram submetidas aos mesmos parâmetros de análise: *smooth=5; saliency=60; minima area=7*. Após padronizados os tratamentos, uma edição manual das imagens dos géis foi realizada através de adição ou deleção dos *spots*, com objetivo de melhorar o alinhamento entre as triplicatas.

A validação dos *spots* dos géis foi realizada através da comparação da triplicata de 7m I9 com a triplicata 10m I9, utilizando análise de variância (ANOVA) com as médias comparadas pelo teste-T ao nível de significância de 5%.

Os pesos moleculares (PM) e os pontos isoelétricos (pI) experimentais das proteínas foram determinados automaticamente pelo programa, utilizando marcador de peso molecular (*Broad range, BioRad*), e os pI teóricos, foram sugeridos pelo banco de dados do *SwissProt* (<http://www.expasy.ch/sprot/>).

4.9 Digestão das proteínas separadas pelo 2D-PAGE

Os *spots* estatisticamente diferentes foram recortados das triplicatas dos géis e fragmentados com auxílio de lâmina tipo bisturi, e submetidos a uma solução descolorante (ANEXO I) até a retirada completa do corante. Após serem desidratados com acetonitrila 100% (ACN), procedeu-se a redução e alquilação dos *spots*.

Inicialmente, os fragmentos de gel foram reidratados com 20 mM de DTT em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 40 min a 56°C. O excesso de líquido foi removido e substituído por 55 mM de iodoacetamida em 50 mM de bicarbonato de amônio. Em seguida, os fragmentos de gel foram mantidos no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. O líquido excedente foi então removido e os fragmentos lavados com 25 mM de bicarbonato de amônio. Após serem novamente desidratados com ACN 100%, os fragmentos foram reidratados com solução de 20 ng.µL⁻¹ de tripsina (*Promega V5111*) em 25 mM de bicarbonato de amônio, pH 8,0. Após a reidratação total, os fragmentos de gel foram parcialmente cobertos com 25 mM de bicarbonato de amônio e a digestão realizada a 37°C por 14 horas.

A ação da tripsina foi interrompida pela adição de solução bloqueadora (ANEXO J) e os peptídeos eluídos dos fragmentos por lavagens sucessivas, com solução de eluição 1 (ANEXO K), solução de eluição 2 (ANEXO L), seguidas da lavagem final com ACN 100%. Em cada uma das etapas de eluição, os fragmentos de gel foram sonicados por 20 minutos a 45°C (*Branson 3510R-DHT*, 42 Hz). Os sobrenadantes de cada *spot* foram transferidos para um único microtubo 1,5 mL, sendo o volume reduzido em concentrador a vácuo (*Concentrator 5301, Eppendorf*), à temperatura ambiente.

4.10 LC-MS/MS

Os peptídeos foram solubilizados em ácido trifluoracético 0,1% em água grau HPLC (*J.T.Baker*), purificados em microcolunas de fase-reversa (*Reverse-Phase ZipTip C18, Millipore*) e transferidos para tubos específicos para realização da espectrometria de massas. O sequenciamento das proteínas foi conduzido em uma plataforma LC-MS/MS em espectrômetro de massas com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) e analisador de massas híbrido quadrupolo/*time of flight* (Q-TOF) *Ultima API* (*Waters*) acoplado a um sistema *on-line* de UPLC capilar *nanoACQUITY* (*Waters*).

A separação dos peptídeos foi realizada utilizando-se uma pré-coluna C18 (*Sentry™ Guard Column C18 Waters*) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (*Symmetry® C18 5 µm 0,32 x 150 mm Waters*). Os peptídeos foram eluídos através da

variação do gradiente do tampão A (95% v/v H₂O, 5% v/v ACN e 0,1% v/v ácido fórmico) e do tampão B (95% v/v ACN, 5% v/v H₂O e 0,1% v/v ácido fórmico). Durante a corrida, o fluxo usado foi de 5 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ nos primeiros 15 min, 2 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ entre 15 e 40 min, e de 5 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ entre 40 e 45 min. A variação de gradiente do tampão B foi de 10% (v/v) a 15% (v/v) em 5 min, de 15% (v/v) a 35% (v/v) em 20 min, de 35% (v/v) a 45% (v/v) em 5 min, 45% a 80% em 5 min, mantido por 5 min a 80% (v/v) e os últimos 5 min em 10% (v/v).

A ionização por *electrospray* foi realizada com a voltagem da fonte ajustada para 3,0 KV e temperatura do cone igual a 90°C, na presença de 5 psi de nitrogênio. A energia de colisão por gás argônio foi mantida em 15 psi. Todos os parâmetros foram definidos através do programa *MassLynx v 2.1 (Waters Corporation)*.

O Q-TOF modelo Ultima API, utilizado nas análises, conta com um sistema *Nanolock Spray* (Waters), que corrige as variações de calibração que ocorrem ao longo do período de aquisição dos espectros de cada amostra. Todas as aquisições foram calibradas com um peptídeo padrão GFP (*GLU¹-fibrinopeptide B*; Sigma), em concentração igual a 100 fmol. μL^{-1} com injeção automática de 1 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

4.11 Análise dos espectros de massas e identificação das proteínas

Os espectros de massas das amostras foram processados utilizando-se os programas *MassLynx NT BioLynx V.4.0* e *ProteinLynx V.2.1* (Waters). Os arquivos de espectros assim processados foram contrastados com o banco de dados do SUCEST (*Sugarcane EST*), através da utilização da ferramenta *MASCOT DEAMON*.

4.12 Seleção dos genes e síntese dos *primers*

Os genes escolhidos foram os genes das enzimas que participam da rota de metabolismo da sacarose, mais especificamente, do chamado “ciclo fútil” (*futile cycles*). Foram escolhidos 7 genes envolvidos diretamente na síntese e quebra da sacarose e 9

genes relacionando indiretamente no metabolismo da sacarose e 2 genes candidatos a normalizadores, totalizando 18 genes avaliados.

Para a síntese dos *primers* dos genes descritos abaixo na Tabela 4, as sequências foram sintetizadas com base no banco de dados do SUCEST-FUN (<http://www.sucest-fun.org>) (VETORE et al., 2003). As sequências de aminoácidos das enzimas alvo anotadas no banco de dados da cana foram contrastadas com banco de dados público NCBI através da ferramenta tBLASTn afim de confirmar o nome da enzima. O próximo passo foi, com auxílio do programa ORFfinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>), identificar o domínio funcional da proteína e realizar um estudo mais aprofundado, através do banco Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). As sequências que foram separadas por isoformas foram alinhadas entre elas pelo programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), com objetivo de desenhar *primers* específicos para cada sequência. Todos os *primers* foram definidos pelo programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e sintetizados na escala de 25 mM (Sigma Genosys).

Tabela 4 - *Primers* selecionados para a análise dos transcritos das enzimas segundo a rota relacionada ao acúmulo de sacarose em plantas de cana-de-açúcar

(continua)

Gene	Sigla	Pares de <i>Primers</i>	Acesso SUCEST/NCBI*
Frutoquinase 1	FRK1	L- GCTCTCTTACGACCCAAACC R- ATGCCTGTCAAGAACTCAAGC	SCRFLR1012E06.g
Frutoquinase 2	FRK2	L- CTTCCACAACGAGGAGAAGC R- CGTGCGTGAGCGTCTAGTT	SCJLRZ1021E10.g
Hexoquinase 1	HK1	L- AAGGAGGTATCCATCCCTCCT R- ATTGCTGTGCCCTTCACTC	SCJLRT1017B04.g
Hexoquinase 2	HK2	L- TACTCTTCATGTGTGCGACCTC R- ATGCTCGTATAAGCCACCATC	SCAGAM2124E02.g
Invertase ácida	ACIN	L- CTGGAGGACGAGACCACACT R- GTGGCGTTGTTGAAGAGGA	SCCCLR1C07F04.g
Invertase da parede celular	CWIN	L- TCAATTCTCTCTTTGCCGG R- TCCTTCAGTTTTCGCCCTT	SCVPRT3086D06.g
Invertase neutra	NTIN	L- TTCCTGTGAAAGGCGGTTAC R- ATGTCATCCCATTTGGCTTC	SCVPCL6065C10.g

Tabela 4 - *Primers* selecionados para a análise dos transcritos das enzimas segundo a rota relacionada ao acúmulo de sacarose em plantas de cana-de-açúcar

Gene	Sigla	Pares de <i>Primers</i>	(conclusão)
			Acesso SUCEST/NCBI*
Quinase protéica relacionada a não fermentação da sacarose	SNRK	L- AACCAGGCCATCTACCTCCT R- ACACGCTCAATCTCGTCCTT	SCCCLR2003B01.g
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	GAPDH	L- ACAACAGCCACCCAGAAGAC R- ATGCCAGTGAGCTTTCCATT	SCCCCL2001B02.b
Glicose 6-P isomerase	G6PI	L- GACCAGCACGCTTACATTCA R- CCTGCAACATCCCAAACAA	SCEQRT1029D09.g
Poliubiquitina	PUB	L- GGTGCTCTCCTTCTGGATGT R- GACCCTTACTGGCAAGACGA	SCCCST2001G02.g
Sacarose fosfatase	SPP	L- GAGCATGGGTGGACAGACTT R- GGCTTGACAGAGAGCACACA	DQ092445.1*
Sacarose fosfato sintase 1	SPS1	L- CGATGCTGAAGGAAAGCTG R- CTTTGATGAGGAAGGCGAAG	SCEQAM1036A06.g
Sacarose fosfato sintase 2	SPS2	L- AAGCACAAATGCAGCTGTTT R- AACCCGATGTATGTCCACA	SCCCLR1C06G07.g
Sacarose sintase	SUSY	L- CCCTCATGGGTACTTTGGTC R- TCTTTGGGGAATAATCAAGC	SCEPCL6023F02.g
Transportador de sacarose 1	SUT1	L- TGTGTTGGCTTTTCGTCAG R- CATGATGACCGCACAAATC	AY780256.1
Transportador de sacarose 4	SUT4	L- ATGCAATGGCTGCTAGTCGT R- CTCAAGGATGAGGACGCAAT	GQ485583.1*
Trehalose 6-P sintase	TPS	L- GGTTCACTTCTCCGTTGAC R- CCAGCAGGTAGTTGGACAGC	SCMCRT2088E01.g

4.13 Extração do RNA total

A extração do RNA total dos tecidos dos internós 5 e 9 de cana de 4, 7 e 10 meses foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Zeng e Yang (2002). Em tubos de centrífuga de 30 mL contendo 10 mL de tampão de extração (ANEXO) foram adicionados 3 gramas de material vegetal pulverizados em nitrogênio líquido. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 15 minutos, sendo então adicionados 6 mL de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico, 24:1). Os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 15.000 *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante aquoso foi transferido para novo tubo contendo 6 mL de CIA, agitado vigorosamente, e centrifugado a 10.000 *g* por 10 minutos a 4°C, repetindo-se este processo por duas vezes. O sobrenadante recuperado foi transferido para novo tubo e o RNA total foi precipitado *overnight* a 4°C com a adição de 0,25 volume de 10 M de LiCl. No dia

seguinte, o *pellet* foi centrifugado a 16.000 *g* por 30 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, adicionaram-se 5 mL de etanol 75%, e centrifugou-se o material a 16.000 *g* por 30 minutos a 4°C, repetindo-se este passo duas vezes. O *pellet* foi seco por 30 minutos então ressuscitado em água deionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

4.13.1 Quantificação do RNA total extraído

A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda, 260 nm e 280 nm. A razão entre as absorbâncias (A_{260}/A_{280}) foi utilizada com critério para inferir sobre a integridade do RNA total extraído. Valores da razão entre 1,6 a 2,0 indicam boa qualidade na extração. A absorbância no comprimento de onda de 260 nm é utilizada para informar a concentração do RNA extraído, de acordo com a fórmula abaixo (SAMBROOK et al., 1989).

$$[\text{RNA}] = (A_{260\text{nm}} * F_c * F_d) / 1000$$

onde:

- $A_{260\text{nm}}$: absorbância a 260nm;
- 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 : fator de diluição da amostra.

4.14 Isolamento do RNA mensageiro e Síntese do cDNA

O isolamento do RNA mensageiro (mRNA) foi realizado com auxílio do *kit Dynabeads[®] mRNA purification* (Invitrogen). De acordo com as normas do fabricante, cada 200 µL da solução de *beads* é capaz de purificar até 75 µg de RNA total. Para cada material, foram isolados 200 µg de RNA total, subdivididos em 4 tubos com 50 µg.

A fita de DNA complementar (cDNA) de cada material foi sintetizada com *primers* dos genes específicos com o auxílio do *kit SuperScriptTM One-Step RT-PCR Platinum[®] Taq* (Invitrogen). A reação de síntese foi preparada com 6,25 µL de 2X *reaction mix* (0,4mM de cada dNTP; 2,4 mM MgSO₄), 4 µL de mRNA, 0,25 µL de RT/Platinum[®] Taq e

1 µL dos *primers* L e R. Os tubos foram colocados em um termociclador (*Gene Amp[®] PCR system 9700, Applied*). com a seguinte programação: 1 ciclo de 49°C por 30 minutos e 94°C por 2 minutos para síntese de cDNA e pré-desnaturação da enzima transcriptase reversa; 10 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 55/57°C durante 1 minuto e 72°C durante 1,5 minutos para amplificação dos fragmentos.

4.15 PCR quantitativo (qPCR)

A reação de qPCR foi composta de 1 µL de cada *primer*, 12,5 µL de SYBR green (*SYBR Green real-time RT-PCR SuperMix-UDG*) e 3 µL de cDNA diluído (10^{-2}), num volume final de 25 µL. Para cada gene as reações foram feitas em triplicata e processadas no equipamento *iQ5* (BioRad) com a seguinte programação: 1 ciclo de 95°C por 15 minutos; 40 ciclos de: 95°C por 20 segundos, 55°C e 57°C (dependendo dos *primers*) por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com leitura da fluorescência a 72°C; 1 ciclo de 95°C por 30 segundos, 1 ciclo de 55°C por 30 segundos e 1 ciclo para construção de curvas de dissociação dos *primers* com a temperatura se elevando de 55°C até 95°C, e a cada minuto leituras da fluorescência.

A análise da expressão gênica foi realizada com o auxílio do aplicativo *LingRegPCR* (RAMARKERS et al., 2003) que fornece uma regressão linear dos dados brutos da PCR possibilitando o cálculo da eficiência individual de cada *primer* nas reações. Já a normalização dos dados de expressão foi feita através da escolha de genes de referência feita pelo *software Norm-finder*.

4.16 Seleção dos genes de referência

Os genes selecionados como potencialmente de referência foram extraídos de trabalhos publicados na literatura (ISKANDAR et al., 2004; PAPINI-TERZI et al., 2009). Foram selecionados quatro genes, sendo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), poliubiquitina (PUB), transportador de sacarose 1 (SUT1) e transportador de sacarose 4 (SUT4). Os valores de estabilidade destes genes foram testados com o

programa *NormFinder* (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>) (ANDERSEN et al., 2004). O fator de normalização foi gerado a partir da media geométrica gerada pela melhor combinação de dois genes, dividindo o valor de fluorescência calculado (N0 calculado) pelo fator de normalização, obtendo-se assim um valor de N0 calculado normalizado.

4.17 Extração dos açúcares solúveis do espaço apoplástico dos colmos de cana-de-açúcar

A extração do fluído apoplástico foi de acordo com o protocolo de Walbaum e Meinzer (1990). Amostras de 1 cm x 0,5 cm x 0,5 cm dos internós 4 a 9 sem a casca, das três idades, 4, 7 e 10 meses foram acomodados em tubos de centrífuga com orifício na parte inferior, este conjunto foi acomodado dentro de outro tubo destinado a coletar todo líquido extraído. As amostras do colmo foram centrifugadas a 480 g por 10 minutos a 4°C. Os tubos contendo o líquido extraído foram congelados imediatamente e acondicionados a -20°C.

4.18 Extração dos açúcares solúveis do simplasto dos colmos de cana-de-açúcar

Os briquetes do colmo após a extração do item 4.17, com cerca de 300 mg cada, provenientes dos internós 4, 5, 6, 7, 8 e 9, das três idades 4, 7 e 10 meses, foram pulverizados com o auxílio do nitrogênio líquido e transferidos para tubos de 15 mL. Foram adicionados 7 mL de água deionizada e os tubos hermeticamente fechados foram mantidos em banho-maria a 80°C por 1 hora. O sobrenadante foi separado do material vegetal através de filtração com auxílio de vácuo. A solução filtrada foi avolumada em balão volumétrico de 200 mL, uma alíquota foi estocada a -20°C.

4.19 Determinação dos açúcares solúveis do colmo de cana-de-açúcar

A quantificação dos açúcares recuperados nos itens 4.17 e 4.18 foram determinados via HPAE-PAD (*High Performance Anion Exchange – Pulsed Amperometric Detection*) ICS 2500 Dionex. Uma curva de calibração foi construída com padrões de glicose, frutose e sacarose (*Sigma*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do conteúdo de açúcares solúveis do colmo de cana-de-açúcar

Os internós 4, 5, 6, 7, 8 e 9 das três idades de coleta 4, 7 e 10 meses, foram analisados em relação ao conteúdo dos seus açúcares solúveis totais mais relevantes, glicose, frutose e sacarose. Os valores apresentados na Tabela 5 mostram as concentrações dos açúcares solúveis totais, os quais aumentam do topo em direção à base da planta. Aos 4 meses passou de 9,58 g/L (I4) para 42,39 g/L (I9), na idade de 7 meses a concentração foi de 25,37 g/L (I4) até 52,34 g/L (I9) e finalmente na coleta com 10 meses a concentração dos açúcares no caldo foi de 49,48 g/L (I4) para 134,08 g/L (I9). O aumento mais acentuado da concentração dos açúcares solúveis totais ocorre nas plantas de 10 meses. As plantas avaliadas nessa idade foram submetidas a um regime de restrição hídrica por 12 dias. Lingle (1999) trabalhou com 7 diferentes cultivares de cana-de-açúcar em condições de campo. As plantas foram manejadas de forma que o ciclo final da cultura enfrentasse restrição hídrica. A autora encontrou para todas as cultivares avaliadas, forte correlação negativa ($r^2 = -95$) entre o conteúdo de água da planta e o teor de sacarose presente no parênquima de armazenamento.

Tabela 5 - Concentração dos açúcares solúveis totais presentes no caldo da cana-de-açúcar para os internós 4 a 9 para as idades de 4 meses, 7 meses e 10 meses. Os valores são expressos em (g/L) do caldo extraído

Internó nº	Açúcares solúveis totais (g/L) [†] ± DVPAD		
	4 meses	7 meses	10 meses
4	9,58 ± 0,37 a	25,37 ± 4,93 a	49,48 ± 5,95 b
5	17,88 ± 2,43 a	32,46 ± 1,66 b	71,19 ± 3,12 c
6	22,32 ± 4,21 a	37,14 ± 4,69 a	71,93 ± 7,03 b
7	32,14 ± 3,68 a	37,56 ± 2,77 a	109,40 ± 7,10 b
8	33,61 ± 3,00 a	46,68 ± 4,85 a	116,96 ± 14,35 b
9	42,39 ± 0,90 a	52,34 ± 6,36 a	134,08 ± 21,17 b

[†] Triplicata biológicas (n=3) com três repetições técnicas

Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,01)

Somente para as plantas de 10 meses foi determinada a concentração dos sólidos solúveis, Brix, do caldo da cana. O acompanhamento da quantidade de sólidos solúveis, em porcentagem, foi utilizado como critério para determinar o período de máximo acúmulo de sacarose nas plantas. A restrição no fornecimento de água foi o fator ambiental principal que contribuiu para a intensificação do acúmulo de sacarose, no período compreendido entre 0 a 16 dias sem irrigação (d.s.i.). A Figura 7, abaixo, mostra como as plantas em condições de restrição hídrica reagem a medida que o conteúdo de água disponível vai diminuindo. Inicialmente há aumento na concentração dos sólidos solúveis atingindo ponto máximo aos 10 d.s.i. Posteriormente ocorre inversão da tendência de alta. Após o 12º d.s.i., há queda acentuada no teor de açúcar do caldo, provavelmente em decorrência do efeito do extenso período de seca em que as plantas foram submetidas. O ponto destacado pela seta (Figura 7) representa o momento da coleta dos internós da haste principal. Parte deste material foi armazenado para as análises moleculares de expressão gênica e perfil protéico.

Figura 7 - Curva de acompanhamento do acúmulo dos sólidos solúveis, com auxílio do refratômetro ótico aos 0, 4; 6; 8; 10; 12; 14, e 16 d.s.i. O ponto indicado pela seta destaca o período definido para das plantas com 10 meses de idade para análises moleculares e de conteúdo de açúcares. D.s.i. – dias sem irrigação

No trabalho realizado por Waclawovsky e colaboradores (2010), os autores relataram aumento do Brix nas variedades estudadas. Entre elas, 2 variedades caracterizadas como alto Brix e 2 variedades caracterizadas como baixo Brix. O

acúmulo dos sólidos solúveis medidos, ocorre justamente no período mais seco do ano, onde há menores índices pluviométricos no campo, período compreendido entre os meses de março a setembro para a região sudeste do Brasil (WACLAWOVSKY et al., 2010).

Do caldo extraído do parênquima de armazenamento dos internós do colmo da cana foi avaliada a concentração dos carboidratos mais representativos, glicose, frutose e sacarose. A Figura 8 mostra a concentração dos três principais açúcares presentes no caldo da cana medidos desde o topo (internó 4) até a base da planta (internó 9).

Figura 8 - Valores dos açúcares solúveis dos internós 4-a-9 presentes no caldo da cana nas três idades de coleta, 4, 7 e 10 meses

A concentração de sacarose na cana aumenta com a redução do crescimento vegetativo (MOORE, 1995; ROBERTSON et al., 1996). Antes de iniciar o período de amadurecimento, o estoque de sacarose, nas células do parênquima, é mantido em baixa concentração. A diferença de concentração da sacarose entre o floema e as células do parênquima de estocagem favorece o processo de descarregamento e clivagem desse dissacarídeo. São os internós em fase de alongamento que demandam maior quantidade de carbono para os gastos energéticos do metabolismo em geral,

como crescimento celular e respiração (ROBERTSON et al., 1996; RAE et al., 2005). As propriedades biofísica do tecido de armazenamento são importantes para determinar a sua capacidade de acumular sacarose. Na maturidade, a concentração da sacarose poderia gerar alta pressão de turgor. Porém, medidas de turgor como extensibilidade da parede celular e condutividade da membrana plasmática, mostraram que a pressão é mantida baixa em decorrência da partição dos solutos que ocorre entre os espaços apoplástico e simplástico (MOORE; COSGROVE, 1991; RAE et al., 2005).

Para estabelecer uma relação entre crescimento das plantas e acúmulo de açúcar, ambos relacionando na Figura 9 abaixo, calculou-se os valores médios de concentração dos açúcares totais para as três idades. Os valores encontrados foram 26,32 g/L, 38,59 g/L e 92,17 g/L, respectivamente. As alturas médias das plantas aos 4, 7 e 10 meses foram 105,88, 256,44 e 263,57 centímetros. Apesar da diferença de aproximadamente 2,5 vezes entre as alturas das plantas de 4 e 7 meses, o teor médio dos açúcares presentes no parênquima do colmo aumentou por volta de 46%. Por outro lado, a diferença média de altura entre as plantas de 7 meses e 10 meses chegou próximo a 7 centímetros e a diferença no conteúdo de açúcares médios entre estas duas idades é próximo de 240%.

Figura 9 - Valores médios da concentração dos açúcares solúveis totais, glicose, frutose e sacarose (linha tracejada) relacionados com a altura média das plantas nos três estádios diferentes de desenvolvimento, perfilhamento: 4 meses; crescimento vegetativo: 7 meses e maturação: 10 meses (linha cheia). ** $p < 0.01$ pelo teste de Tukey

O crescimento e o desenvolvimento do ápice das plantas de cana se processam desde os primeiros internós do meristema até por volta dos internós 6-7, quando estes estão terminando o processo de alongamento, mas ainda não acumulam expressivas concentrações de sacarose. A partir dos internós 7-8, estes já estão completamente alongados e já estão aptos a acumularem concentrações mais elevadas de sacarose (GLASZIOU; GAYLER, 1972; MOORE, 1995). Dessa maneira, o processo de desenvolvimento da cana-de-açúcar é contínuo, resultando num gradiente de maturação e acumulação de sacarose ao longo do seu colmo, até o ponto onde a maturidade completa é atingida e os maiores teores de sacarose são alcançados (MOORE, 1995).

Lingle (1999) mostrou que o alongamento completo de um internó recém formado, logo abaixo da folha +1, se dá rapidamente, por volta de 20 dias. A autora descreve que o alongamento dos internós do colmo foi finalizado por volta do 8º para o 9º meses. As plantas mantiveram a mesma altura até o fim do ciclo de coletas do experimento, que foi por volta dos 15 meses de idade (LINGLE, 1999). Na fase de alongamento dos internós os fotoassimilados são utilizados para formar estruturalmente esse tecido. A taxa de assimilação deve ser maior que a taxa de utilização dos fotoassimilados. Essa diferença entre assimilação e utilização, particularmente, para a cana-de-açúcar é importante porque o principal produto, a sacarose, é potencialmente passível de acumulação já na fase final de alongamento (KOMOR, 2000).

5.2 Análise do transcrito da cana-de-açúcar

5.2.1 PCR quantitativo (qPCR)

Para avaliar a expressão dos genes das enzimas responsáveis na regulação da rota de acumulação de sacarose dos colmos de cana-de-açúcar foram escolhidos genes de enzimas que participam diretamente do metabolismo da sacarose. As quantificações das expressões desses genes auxiliam no entendimento da regulação do processo de estocagem da sacarose.

5.2.2 Escolha do gene de referência

Um gene para ser considerado como gene de referência deve se expressar com menor nível de variação possível, nos mais diferentes tecidos e em todos os estádios de desenvolvimento (BUSTIM, 2000). Para a cana-de-açúcar apenas o trabalho de Iskandar et al. (2004) descreve alguns genes normalizadores. Os genes candidatos a normalizadores testados foram: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), avaliado no trabalho desenvolvido por Iskandar e colaboradores (2004) apontado como sendo o gene que apresenta menor variação entre os diferentes tecidos avaliados. Outro gene, poliubiquitina (PUB), utilizado por Papini-Terzi e colaboradores (2009). Os autores encontraram este como o mRNA mais estável tanto na população das progênes quanto nos tecidos individuais. Por último, outra classe de gene, os “sucrose transporter” (SUT1 e SUT4), foram testados como genes normalizadores por apresentarem alta expressão nos tecidos que circundam os feixes vasculares tanto de folhas quanto dos internós da planta de cana-de-açúcar. Os genes SUT1 e SUT4 participam de um grupo onde se encontram apenas transportadores de monocotiledôneas (LALONDE et al., 2004). Estes transportadores SUTs codificam proteínas altamente hidrofóbicas, que consistem de 12 domínios transmembrana e são amplamente encontrados nas folhas e internós do colmo de cana-de-açúcar. Análises por imunolocalização identificaram essas proteínas nas células periféricas dos feixes vasculares dos internós (RAE et al., 2005). Pelo fato dessas proteínas participarem do processo de descarregamento e carregamento das células do parênquima do colmo, a expressão desses transportadores é abundante e sofre pouca alteração no decorrer do amadurecimento do colmo de cana (ISKANDAR et al., 2004).

Através do programa *NormFinder* calculou-se os valores de estabilidade dos possíveis genes testados como referência: GAPDH, PUB, SUT1 e SUT4. Como resultado, este programa indica qual é o melhor gene através de um *ranking* de estabilidade. Quanto menor o valor da estabilidade gerada pelo programa mais estável é o gene. Dessa forma, dos quatro genes testados, SUT4 apresentou o menor valor de estabilidade igual a 0,32, seguido do GAPDH 0,38, SUT1 0,54 e PUB 0,65, Figura 10, abaixo.

Figura 10 - Valores de estabilidade gerado pelo programa *NormFinder* dos genes potencialmente considerados como referência. Poliubiquitina (PUB); gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH); “sucrose transporter 1” (SUT1), “sucrose transporter 4” (SUT4) e melhor combinação entre dois genes (PUB+SUT1)

Outro ferramenta disponibilizada pelo programa *NormFinder* é a melhor combinação entre dois genes. Nesta melhor combinação, o programa elege dois genes entre a gama de genes candidatos à normalizadores, e atribui a estes um valor de estabilidade. Neste caso, o programa considerou a combinação PUB+SUT1 com os genes mais estáveis, e atribuiu um valor igual a 0,36. Valores de estabilidade próximos ao intervalo de 0,2-0,3 são considerados suficientemente estáveis e confiáveis para serem empregados na normalização dos dados. No processo de normalização dos dados dos genes alvo, a média geométrica dos valores de expressão dos genes PUB e SUT1 foram utilizados como o fator de normalização.

5.2.3 qPCR dos genes das enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose nos internós de cana-de-açúcar

- *Sacarose fosfato sintase – SPS e Sacarose fosfato fosfatase – SPP*

A verificação dos níveis de expressão dos transcritos das isoformas do gene SPS1, SPS2 e SPP podem ser visualizadas na Figura 11. Os valores observados são valores de expressão normalizada utilizando a expressão dos genes de referência PUB

e SUT1 como normalizadores para os internós 5 e 9, nas diferentes idades de coleta, 4, 7 e 10 meses.

Figura 11 - Nível de expressão normalizada dos transcritos dos genes SPS1, SPS2 e SPP nos internós imaturos e maduros nos três estádios distintos de desenvolvimento. SPS1-sacarose fosfato sintase 1; SPS2-sacarose fosfato sintase 2; SPP-sacarose fosfato fosfatase; I5-internó número 5; I9-internó número 9; 4m-4 meses de idade; 7m-7 meses de idade e 10m-10 meses de idade. Os valores do eixo y foram normalizados com a média geométrica dos dois genes de referência PUB e SUT1 utilizados como padrão interno. ** $p < 0,01$ pelo teste de Tukey entre os internós dentro das idades

Os valores referentes à expressão normalizada da isoforma SPS1 foram colocados acima das barras na Figura 11, e mostram que há diferenças no perfil transcricional da SPS1 entre as idades. Para acompanhar a variação da expressão da isoforma SPS1 dentro de cada idade e entendermos como essa isoforma se comporta com o avanço da idade, dividimos o valor da expressão no internó 9 pelo valor da expressão do internó 5, obtendo assim um valor de expressão relativo. O valor de

expressão relativa calculado aos 4 meses foi 0,025, passou para 0,334 aos 7 meses e chegou ao máximo aos 10 meses com 2,904, aumento de 116 vezes no período de avaliação do experimento (dos 4 meses aos 10 meses). Quando avaliamos o aumento da expressão normalizada somente para o internós 9 das três idades, encontramos aumento mais acentuado aos 10 meses. Os valores passam de 0,011 aos 4 meses para 0,061 aos 7 meses alcançando 0,39 aos 10 meses. Esse aumento representa incremento de mais de 35 vezes no valor da expressão do transcrito da SPS1.

Já a isoforma SPS2 prevalece com o nível de expressão normalizada maior no internó 9 em comparação ao internó 5 nas três idades. Ao compararmos os valores da expressão dos transcritos da SPS2 do internó 9 observamos que o aumento no valor foi de 3,1 vezes, passando de 1,98 aos 4 meses para 3,85 aos 7 meses atingindo 6,14 aos 10 meses. A isoforma SPS2 também aumentou os valores de expressão relativa entre os internós 9 e 5, porém de forma menos acentuada quando comparada à isoforma SPS1. O valor das razões foram 1,10, 1,69 e 4,43 aos 4, 7 e 10 meses, respectivamente, Figura 11.

Similarmente observado por Verma e colaboradores (2011) os valores atribuídos à expressão gênica, utilizando a técnica de PCR semi-quantitativo, revelaram que o transcrito do gene da SPS foi diferencialmente expressos entre internós maduros e imaturos, em ambas cultivares avaliadas para alto e baixo teor de sacarose. O mesmo estudo revelou que houve aumento na expressão do transcrito da SPS quando observadas as plantas a partir dos 240 aos 390 dias após o plantio. Os autores também descrevem que há correlação positiva entre a atividade da enzima SPS, avaliada por atividade enzimática e o nível de expressão do transcrito para todas as cultivares avaliadas. A intensa atividade enzimática e o aumento do nível de expressão do transcrito da SPS foram associados com os altos teores de sacarose nos internós maduros dos colmos de cana-de-açúcar (BOTHÁ; BLACK, 2000). Estas evidências sugerem que o gene da SPS realiza papel fundamental no processo de síntese e acúmulo de sacarose nos internós em processo de maturação (MOORE, 1995; BOTHÁ; BLACK, 2000; VERMA et al., 2011).

Existem múltiplas famílias de genes para a SPS em cana-de-açúcar. No trabalho conduzido por Grof e colaboradores (2006) foram identificadas 4 famílias, descritas como A, B, C, e D, as quais apresentam expressão diferencial dentro do parênquima do colmo para as canas avaliadas com seis meses de idade. As famílias A e D apresentam maior nível de expressão tanto nos internós imaturos quanto nos internós maduros (GROF et al., 2006). Na família de gene da SPS-A, a expressão do transcrito aumenta com a elevação da concentração da sacarose no parênquima do colmo. A expressão da SPS-D não apresenta variação ao longo do colmo da cana (GROF et al., 2006).

Também, foi avaliado o nível de expressão do gene da sacarose fosfato fosfatase, SPP. Esta enzima é responsável, no parênquima do colmo, por retirar a molécula de fosfato da sacarose-6P, produto gerado pela ação da SPS (UYS et al., 2007). A Figura 11 acima, mostra os valores de expressão normalizada pelos genes de referência PUB e SUT1. A expressão do transcrito da SPP nos internós 5 e 9 nas idades de 4 e 7 meses é praticamente constante. Somente aos 10 meses, sob condição de restrição hídrica, a expressão da SPP variou acentuadamente. Considerando o valor da expressão relativa entre os internós 9 e 5, o transcrito da SPP aumenta a expressão com o avanço da idade, passando de 0,67 para 0,96 chegando a 3,98.

O estudo da via de biossíntese de sacarose em outras espécies pode servir como modelo para a compreensão do processo de acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar. Dai e colaboradores (2011) avaliaram a expressão de 42 genes, através da tecnologia de pirosequenciamento (*Roche 454*), de frutos de melão (*Cucumis melo*) em desenvolvimento. Todos os genes selecionados codificam enzimas diretamente relacionadas na rota do metabolismo da sacarose. A característica mais impressionante apresentada pelos frutos de melão em amadurecimento segundo os autores, é a superexpressão dos genes CmSPS1 e CmSPP1, direcionando o fluxo dos açúcares solúveis para a formação da sacarose. O aumento da expressão do transcrito CmSPS1 é refletido no aumento da atividade da enzima SPS nas frutas em desenvolvimento (BURGER; SCHAFFER, 2007). Ainda, o padrão de expressão do CmSPP1 aumenta significativamente no amadurecimento dos frutos, correlacionando a combinação desses dois genes na reação de síntese da sacarose (DAI et al., 2011).

- *Sacarose sintase – SUSY*

Internós que estão em estádios diferentes de desenvolvimento são ideais para a investigação da contribuição da enzima SUSY no processo de acumulação de sacarose (BOTHÁ; BLACK, 2000). A Figura 12 mostra o perfil de expressão dos transcritos do gene da SUSY nas três idades, 4, 7 e 10 meses. Em todas as idades a expressão normalizada dos transcritos do internó 9 foi maior que o nível de expressão do internó 5. Em particular, a expressão do transcrito do internó 9 aos 10 meses destoa dos demais internós maduros das outras idades.

Figura 12 - Nível de expressão normalizada do transcrito do gene SUSY nos internós imaturos e maduros nos três estádios distintos de desenvolvimento. SUSY-sacarose sintase; I5-internó número 5; I9-internó número 9; 4m-4 meses de idade; 7m-7 meses de idade e 10m-10 meses de idade. Os valores do eixo y foram normalizados com a média geométrica dos dois genes de referência PUB e SUT1 utilizados como padrão internó. ** $p < 0,01$ pelo teste de Tukey entre os internós dentro das idades

Existem poucos trabalhos na literatura sobre o transcrito dos genes envolvidos no processo de acúmulo de sacarose em colmo de cana-de-açúcar. Em um desses trabalhos, Verma e colaboradores (2011) verificaram que a expressão dos transcritos da SUSY diminui tanto para os internós imaturos quanto para os internós maduros em plantas que variaram de 8 a 13 meses de idade em condições de campo. A correlação negativa entre SUSY e sacarose à medida que a planta vai acumulando

açúcar, deve-se principalmente ao fato de que a enzima SUSY é uma das únicas vias de clivagem da sacarose em plantas, com exceção das invertases (KOCH, 2004). Porém, mesmo contradizendo os dados apresentados em nosso trabalho, a expressão da enzima SUSY pode variar de acordo com o tipo e o *status* metabólico do tecido avaliado, isoformas da enzima SUSY, padrões de expressão separados espacial e temporalmente e mecanismos de regulação a nível transcricional e traducional (DEJARDIN et al., 1999). O perfil de expressão dos transcritos da Figura 12 acima, leva em consideração possivelmente mais de uma isoforma da SUSY. A amplificação dos transcritos da SUSY foi realizada com base na sequência do domínio funcional da proteína, e dessa maneira, a amplificação de outras isoformas presentes no parênquima do colmo da cana pode ter ocorrido.

Schäfer e colaboradores (2005) descrevem, através da cromatografia de troca aniônica, a presença de três isoformas do gene da SUSY em cana-de-açúcar, SUSYA, SUSYB e SUSYC em internó 9 maduro e folhas jovens do ponteiro da planta. Provavelmente a distinção entre estas três isoformas esteja justamente na razão de quebra/síntese da sacarose (SCHÄFER et al., 2005). Nos internós maduros de cana-de-açúcar as isoformas SUSYB e SUSYC possuem maior razão de quebra/síntese quando comparadas com a isoforma SUSYA. Por outro lado, as folhas jovens possuem maior atividade da SUSYA. Esta isoforma contribui para a formação da sacarose em tecidos jovens devido a menor razão de quebra/síntese da sacarose. A inversão das atividades das isoformas da SUSY nos diferentes tecidos faz todo sentido, pois a razão de quebra/síntese da sacarose tende a aumentar a medida que os internós vão amadurecendo (BUCZYNSKI et al., 1993). A atividade total da enzima SUSY está mais voltada para a quebra da sacarose no internó maduro do que em folhas jovens (SCHÄFER et al., 2005).

Outras evidências que corroboram com Schäfer et al. (2005) foram descritas por Botha e Black (2000). O trabalho avaliou a atividade da enzima SUSY através de estudos com marcadores radioativos e mostrou que a SUSY está exclusivamente envolvida na quebra da sacarose em internós maduros, porém, contribui também para síntese de sacarose em internós imaturos. Contudo, há que se ter muito cuidado em

qualquer tipo de conclusão obtida por esses ensaios, uma vez que as condições conduzidas para os experimentos são diferentes das condições encontradas em reações realizadas *in vivo* (BOTHÁ; BLACK, 2000).

Em plantas de melão (*C. melo*) no processo de amadurecimento foram identificadas três isoformas da SUSY segundo Dai e colaboradores (2011). De acordo com os autores, a isoforma SUSY1 é mais expressa em frutos jovens no 10º dia após a abertura das flores. Subsequentemente, o nível de sua expressão declina rapidamente e praticamente não há mais expressão dessa isoforma durante o processo de amadurecimento da fruta. A isoforma SUSY2 mantém os níveis de expressão baixos durante todo o processo de desenvolvimento do fruto. Em contraste, SUSY3 possui baixa expressão nos frutos jovens e aumenta a expressão à medida que a fruta vai amadurecendo.

Para Schaffer (2005) o papel da SUSY no processo de acúmulo de sacarose ainda permanece pouco evidente. O autor descreve em seu trabalho com diversos genótipos de melão (*C. melo*) que a atividade da SUSY está positivamente correlacionada, ou no mínimo, não negativamente correlacionada com o acúmulo de sacarose no fruto. Alguns estudos atribuem a quebra da sacarose ao papel catalítico da SUSY, numa relação inversamente proporcional entre sacarose e a enzima SUSY (HUBBARD et al., 1989), porém, Schaffer (2005) descreve que houve aumento da atividade da enzima SUSY caracterizada, principalmente, pelo acúmulo de sacarose nos frutos, e não o contrário. A contribuição da SUSY no processo de acúmulo de sacarose é justamente exercer seu papel catalítico no citossol das células do parênquima e manter a concentração da sacarose em níveis baixos neste compartimento. Todo o estoque de sacarose é mantido no vacúolo das células do parênquima (AVIGAD, 1982).

- *As invertases*

A invertase é uma enzima chave para a hidrólise da sacarose à glicose e frutose. Em plantas superiores a invertase se expressa em diferentes isoformas com diferentes

propriedades bioquímicas e em diferentes localizações subcelulares. As três principais isoformas são invertase ácida solúvel (ACIN), invertase ácida ligada à parede celular (CWIN) e invertase neutra (NTIN) (FOTOPOULOS, 2005).

- *Invertase ácida solúvel - ACIN*

A Figura 13 abaixo, mostra a expressão do transcrito da ACIN e as concentrações da sacarose e hexoses presente no simplasto, representadas pelas linhas preta e vermelha, respectivamente.

Figura 13 - Nível de expressão do transcrito do gene ACIN nos internós imaturos e maduros nos três estádios distintos de desenvolvimento. ACIN-invertase ácida; I5-internó número 5; I9-internó número 9; 4m-4 meses de idade; 7m-7 meses de idade e 10m-10 meses de idade. Os valores do eixo y primário foram normalizados com a média geométrica dos dois genes de referência PUB e SUT1 utilizados como padrão interno. O eixo y secundário é a concentração (g/L). **p<0,01 pelo teste de Tukey entre os internós dentro das idades

Para as três idades de coleta, Figura 13 acima, a concentração de sacarose diminui quando há intensificação da expressão do transcrito da ACIN, e vice-versa.

Verma e colaboradores (2011) determinaram a atividade enzimática da ACIN e correlacionaram esta à expressão do transcrito da ACIN. Todas as cultivares avaliadas pelos autores neste trabalho, quatro no total, apresentaram correlação positiva entre a atividade da enzima e expressão do seu gene. O trabalho concluiu que a diminuição na atividade da enzima ACIN e da expressão do transcrito da ACIN estão ligadas ao aumento no conteúdo de sacarose no colmo, ou seja, as maiores atividades da enzima ACIN são encontradas usualmente em tecidos que apresentem rápido crescimento (VERMA et al., 2011). A enzima ACIN também pode desempenhar a função de remobilização da sacarose estocada no vacúolo. Este processo de remobilização pode regular os níveis de hexoses no parênquima do colmo de cana-de-açúcar, o chamado ajuste osmótico (SACHER et al., 1963; VERMA et al., 2011).

Em frutos maduros de tomate (*Lycopersicon esculentum*) a principal função da alta e constante atividade enzimática da invertase ácida é manter o estoque de hexoses elevado. A quantidade total de hexoses encontrada nos frutos e folhas é determinada pela atividade da invertase ácida vacuolar. O decréscimo na atividade enzimática da invertase ácida leva ao aumento da razão sacarose/hexoses (NGUYEN-QUOC; FOYER, 2001).

As concentrações de hexoses do interior das células de estocagem estão diretamente relacionadas com o estágio de desenvolvimento do internó (ROBERTSON et al., 1996). Durante os estádios de desenvolvimento, perfilhamento e crescimento vegetativo, o conteúdo das hexoses ou açúcares redutores é alto, enquanto o conteúdo de sacarose é menor nos internós. Na maturação da cana, o conteúdo de açúcares redutores, glicose e frutose, tornam-se baixos e a sacarose começa a acumular (PAN et al., 2009). Nesse sentido, uma relação inversamente proporcional também foi encontrada em nosso trabalho. Porém, a linha vermelha, correspondente ao conteúdo de hexoses, Figura 13 acima, não responde proporcionalmente à variação no conteúdo de sacarose pelo menos nas idades de 4 e 7 meses. Isto provavelmente ocorre porque a concentração de glicose e frutose medidas é proveniente do simplasto, que inclui todos os compartimentos celulares. A sacarose presente no citossol das células de estocagem do colmo é alvo da ação de outras isoformas da invertase, como por

exemplo a invertase neutra (ROSE; BOTHA, 2000; BOSCH et al., 2004). Somente foi observado essa correlação inversa, entre a sacarose e as hexoses, mais acentuadamente aos 10 meses de idade. Essas plantas já estão num período de amadurecimento e por consequência seu metabolismo menos intenso.

A atividade da enzima ACIN ocorre primariamente nos vacúolos das células do parênquima de estocagem, porém pode-se detectar a atividade da ACIN no espaço apoplástico também (HAWKER et al., 1991; ZHU et al., 1997). Em cana-de-açúcar, as células do parênquima do colmo estocam altas concentrações de sacarose. Os vacúolos são grandes e ocupam quase toda a porção do volume celular das células de estocagem (RAE et al., 2009, 2011). No trabalho conduzido por Rae e colaboradores (2011) utilizando marcação com anti-corpo para a enzima ACIN, os internós 5 e internós 10 dos colmos de cana foram avaliados. A atividade da enzima ACIN indicada pela intensificação da fluorescência foi detectada majoritariamente na porção central das células intactas do parênquima de estocagem, que corresponde justamente à porção do vacúolo. A detecção da enzima ACIN no vacúolo em ambos os tecidos, internós 5 e 10, apoia a ideia de que há uma atividade continuada desta enzima na ciclagem dos açúcares nos internós maduros do colmo da cana (RAE et al., 2011).

- *Invertase ácida ligada à parede celular - CWIN*

A principal função da CWIN é de clivar a sacarose depositada nos espaços entre as paredes celulares das células do parênquima do colmo (espaço apoplástico), e os produtos gerados, glicose e frutose, são transportados através da membrana plasmática das células de estocagem do parênquima (ROITSCH; GONZÁLEZ; 2004).

Os valores da expressão do transcrito da CWIN é mostrado pela Figura 14, abaixo. O valor de expressão da CWIN dos internós 5 e 9 aos 4 e 10 meses apresentam valores muito parecidos entre as idades, porém de forma geral aos 10 meses há pequeno aumento. Esta diferença, provavelmente seja em decorrência do estágio de desenvolvimento que as plantas foram coletadas. No parênquima de armazenamento, uma das rotas de descarregamento do floema inclui a rota apoplástica

(LALONDE et al., 2003). Levando em consideração o parênquima de armazenamento, esse tipo de rota de descarregamento é mais relevante em tecidos com relativa maturidade (RAE et al., 2005).

Figura 14 - Nível de expressão do transcrito do gene CWIN nos internós imaturos e maduros nos três estádios distintos de desenvolvimento. CWIN-invertase ácida ligada à parede celular; I5-internó número 5; I9-internó número 9; 4m-4 meses de idade; 7m-7 meses de idade e 10m-10 meses de idade. Os valores do eixo y primário foram normalizados com a média geométrica dos dois genes de referência PUB e SUT1 utilizados como padrão interno. ** $p < 0,01$ pelo teste de Tukey entre os internós dentro das idades

Nas canas de 7 meses, a expressão do transcrito da CWIN seguem um padrão diferente ao apresentado nas outras duas idades. O internó 5 aos 7 meses possui maior expressão quando comparado ao internó 9. O fato do perfil transcricional das plantas de 7 meses divergirem do perfil das plantas de 4 e 10 meses sugere que há uma sazonalidade da expressão do gene da CWIN dependente do estágio de desenvolvimento da planta.

A CWIN é muito pouco caracterizada em cana-de-açúcar, mesmo para outras espécies de interesse a CWIN ainda é muito pouco estudada (VATTUONE et al., 1981; TYMOWSKA-LALANNE, 1998). A investigação realizada por Albertson et al. (2001) mostrou que há grande variação da atividade da CWIN em folhas imaturas(-1) e

maduras (+1) de cana e que a atividade apresentada pela CWIN foi maior em folhas imaturas.

- *Invertase neutra - NTIN*

Em contraste às outras invertases, ACIN e CWIN, a enzima NTIN não é glicosilada e hidrolisa somente a sacarose. A sua atividade é fortemente inibida pela quebra da sacarose e a geração dos seus produtos, as hexoses (ROITSCH; GONZÁLEZ; 2004).

A Figura 15, abaixo, mostra o perfil de expressão do transcrito da NTIN, para os internós maduros e imaturos nas três idades. As linhas de cores vermelha e verde indicam os teores de sacarose e frutose, respectivamente, presente no simplasto das células do parênquima dos internós 5 e 9, nas três idades. Aos 4 meses o internó 5 possui maior expressão quando comparado ao internó 9 da mesma idade, e a concentração de sacarose, linha vermelha, é menor em relação a concentração de sacarose presente no internó 9.

Figura 15 - Nível de expressão do transcrito do gene NTIN nos internós imaturos e maduros nos três estádios distintos de desenvolvimento. NTIN-invertase neutra; I5-internó número 5; I9-internó número 9; 4m-4 meses de idade; 7m-7 meses de idade e 10m-10 meses de idade. Os valores do eixo y primário foram normalizados com a média geométrica dos dois genes de referência PUB e SUT1 utilizados como padrão interno. O eixo y secundário é a concentração (g/L). ** $p < 0,01$ pelo teste de Tukey entre os internós dentro das idades

Aos 7 meses de idade, fase de crescimento vegetativo, a expressão dos transcritos NTIN é semelhante nos dois tecidos avaliados, internó 5 e 9. Na mesma linha, Albertson e colaboradores (2001) encontraram que nas plantas de cana-de-açúcar em pleno desenvolvimento vegetativo apresentam pequenas mudanças na atividade da enzima NTIN entre os diversos internós avaliados, do internó 2 ao internó 14, dentro do mesmo colmo (ALBERTSON et al., 2001).

Existe relação negativa entre a atividade da enzima NTIN e a concentração de glicose e frutose oriundas da clivagem da sacarose pela ação da NTIN (VOSTER; BOTHA, 1998). O mecanismo inibitório exercido pelas hexoses sob a NTIN controla a atividade dessa enzima. Particularmente, a frutose é mais eficaz comparada à glicose no mecanismo inibitório da enzima NTIN. Uma concentração de 10 mM de frutose é 40% mais efetiva que a mesma concentração de glicose. A inibição da atividade da NTIN pelo seus produtos também foram demonstrados em outras espécies, como milho (VAN DEN ENDE; VAN LAERE, 1995) e cenoura (LEE; STRUM, 1996). A geração do produto inibitório da NTIN, principalmente a frutose, atua como um mecanismo para o “controle fino” da produção de hexoses e ciclagem da sacarose no citossol (VORSTER; BOTHA, 1998). A concentração de frutose (linha verde) medida nos internós 5 e 9 ao 7 meses, Figura 15 acima, possivelmente atue como mecanismo regulatório da NTIN. A atuação das hexoses como inibidoras parece ser mais significantes nos internós imaturos (internó 2) e maduros (internó 10) quando comparados aos internós maduros na base da planta (internó 20) (VORSTER; BOTHA, 1998).

A expressão da NTIN e a concentração da sacarose nas células de parênquima dos internós 5 e 9 alteraram sensivelmente aos 10 meses, comparado às idades de 4 e 7 meses, Figura 15. Aos 10 meses, as plantas estão no processo de maturação e submetidas ao regime de restrição hídrica, o internó 9 apresenta maior expressão comparado ao internó 5 na mesma idade.

Talvez o fato mais curioso ocorre quando comparamos as expressões dos internós 5 e 9 de 4 meses com as expressões do internós 5 e 9 de 10 meses. Existe uma certa equivalência entre o internó 5 de 4 meses com o internó 9 de 10 meses. Da mesma forma, entre os internós 9 de 4 meses com o 5 de 10 meses.

Em frutas de melão (*C. melo*) em processo de amadurecimento, houve aumento na expressão genes da NTIN a medida que o fruto foi acumulando sacarose (DAI et al., 2011; BURGER; SCHAFFER, 2007). De fato, o papel fisiológico da NTIN no metabolismo da sacarose ainda não é muito claro. A correlação positiva entre sacarose e NTIN é um ponto que deve ser repensado do ponto de vista do metabolismo da sacarose, dentro do contexto do processo de acumulação (BURGER; SCHAFFER, 2007).

A correlação inversa entre sacarose e NTIN também é descrita na literatura. Rose e Botha (2000) avaliaram o perfil de atividade da enzima NTIN em plantas de cana-de-açúcar com 18 meses de idade em condição de campo. Os autores encontraram que a atividade da enzima diminui com o avanço da maturidade dos internós como o reflexo do processo de acúmulo da sacarose. Na verdade, a enzima NTIN é uma opção das duas rotas possíveis de hidrólise da sacarose no citossol, invertases ou SUSY. A taxa com que a sacarose é alocada do citossol para o vacúolo, um compartimento subcelular, é importante principalmente nos internós maduros, pois a presença da sacarose no citossol altera a produção de hexoses (ROSE; BOTHA, 2000).

- *Hexoquinase – HK e Frutoquinase – FRK.*

Como discutido anteriormente, a hidrólise da sacarose nos tecidos das plantas pode ocorrer somente pela ação de duas enzimas, as invertases e a sacarose sintase. As invertases geram dois monossacarídeos, glicose e frutose, os quais podem ser fosforilados antes de entrar na rota glicolítica, por exemplo. Já a sacarose sintase gera o UDP-glicose e frutose. Em vista disso, a hexoquinase e a frutoquinase realizam uma reação irreversível de fosforilação dos monossacarídeos, glicose e frutose, gerando glicose 6-fosfato e frutose 6-fosfato, utilizando um nucleotídeo trifosfato como doador (PEGO; SMEEKENS, 2000). Em cana-de-açúcar, durante o processo de acúmulo de sacarose há uma considerável ciclagem entre sacarose e hexoses, e ainda, durante essa ciclagem do carbono em sacarose e hexoses há a captação da hexose exógena pela célula de estocagem, por esse motivo, as enzimas hexoquinase e frutoquinase

desempenham papel fundamental no controle e regulação gênica da rota de acumulação da sacarose (WHITTAKER; BOTHA, 1997). Hoepfner e Botha (2004) encontraram evidências da presença de 5 isoformas da enzima que fosforilam hexoses no colmo da cana. Duas utilizam preferencialmente a frutose, as outras três restantes, fosforilam tanto a glicose como a frutose.

As barras da Figura 16 A, B, C e D representam a expressão dos transcritos das isoformas HK1, HK2, FRK1 e FRK2, respectivamente. Pela Figura 16 A e B, fica evidente que os níveis de expressão das isoformas são diferentes.

Figura 16 - Nível de expressão do transcrito do gene HK1 (A), HK2 (B), FRK1 (C) e FRK2 (D) nos internós imaturos e maduros nos três estádios distintos de desenvolvimento. HK1-hexokinase 1; HK2-hexokinase 2; FRK1-frutoquinase 1; FRK2-frutoquinase 2; I5-internó número 5; I9-internó número 9; 4m-4 meses de idade; 7m-7 meses de idade e 10m-10 meses de idade. Os valores do eixo y foram normalizados com a média geométrica dos dois genes de referência PUB e SUT1 utilizados como padrão interno. **p<0,01 pelo teste de Tukey entre os internós dentro das idades

A expressão da isoforma HK1 é pelo menos duas ordens de magnitude menor que a expressão da isoforma HK2. A mesma diferença entre a expressão das isoformas FRK1 e FRK2 foi identificada, Figura 16 C e D. Em particular o gene da isoforma FRK2 apresentou maior nível de expressão comparado a HK1, HK2 e FRK1.

A expressão das isoformas HK1 e HK2 nos diferentes tecidos para as diferentes idades segue o mesmo padrão. A isoforma HK2 parece estar mais ligada ao processo de fornecimento de energia para as plantas em fase de crescimento rápido (HOEPFNER; BOTHA, 2004). De modo geral, as hexoquinases fosforilam os monossacarídeos glicose e frutose. As moléculas de glicose 6-P e frutose 6-P são a porta de entrada para a via da glicólise, principal via para fornecer ATP e NAD nas células em crescimento (REES, 1985). Aos 10 meses os internós imaturos já finalizaram seu alongamento (LINGLE, 1999), dessa forma a necessidade de energia proveniente dos intermediários da respiração celular é reduzida.

Como discutido anteriormante no tópico da invertase neutra, a expressão da frutoquinase pode estar estreitamente relacionada à expressão da NTIN. A sacarose ao ser depositada no citossol é clivada pela ação da enzima NTIN gerando glicose e frutose. A frutose por sua vez pode ser fosforilada pelas isoformas da FRK, em especial a FRK2. Nota-se, sobretudo, que as tendências de inversão da expressão nos internós 5 e 9 das Figuras 15 e 16-D são parecidos.

5.2.4 Comparação da expressão dos transcritos das enzimas nos internós maduros de colmos de cana-de-açúcar

Neste tópico do trabalho avaliaremos o comportamento dos transcritos das enzimas envolvidas diretamente no processo de quebra e re-síntese da sacarose, como: sacarose sintase, sacarose fosfato sintase, sacarose fosfato fosfatase e invertase, bem como os transcritos das enzimas que não estão envolvidas diretamente no processo de quebra e re-síntese da sacarose, como: hexoquinase, frutoquinase, glicose 6-fosfato isomerase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, quinase protéica relacionada à não fermentação da sacarose, trehalose 6-fosfato e transportador de

sacarose 4. Para isso utilizaremos somente os parênquimas de estocagem dos internós maduros número 9 das plantas de 7 e 10 meses.

A expressão relativa de todos os transcritos foi realizada adotando o internó 9 de 7 meses como controle, sendo assim, a razão fixada foi $\text{int.9-10m/int.9-7m}$. A principal justificativa é o fato de as plantas a partir do 7º mês não apresentarem crescimento significativos, como mostrado na Figura 9. Na Figura 9 a linha relativa às alturas das plantas não mostram diferença estatística entre as idades de 7 e 10 meses. Portanto, a avaliação do perfil transcricional nestes internós maduros está fortemente relacionando ao processo de acúmulo de sacarose. A concentração da sacarose do internó 9 aos 10 meses, 107,17 g/L, aumentou 5,18 vezes quando comparado ao internó 9 aos 7 meses, 20,66 g/L, (Figura 8).

De acordo com os dados apresentados na Figura 17 abaixo, o valor da expressão relativa ACIN, 4,10, foi aumentada no internó 9 das plantas de 10 meses. A expressão da ACIN está fortemente correlacionada à atividade da enzima ACIN, como discutido anteriormente por Verma e colaboradores (2011), dessa maneira, o nível de expressão da ACIN fornece um indicativo sobre a atividade hidrolítica da enzima ACIN aos 10 meses. A ACIN, que atua principalmente nos vacúolos das células de estocagem está diretamente relacionada com a ciclagem da sacarose nas células, o chamado ciclo “fútil da sacarose” (RAE et al., 2009, 2011).

Figura 17 - Expressão relativa de 16 genes localizados no parênquima de estocagem do internó maduro (I9) de cana-de-açúcar com 10 meses de idade. Os genes avaliados estão envolvidos com a rota de acúmulo de sacarose. Os valores do eixo x são em relação ao internó maduro (9) das canas com 7 meses de idade. ACIN-invertase ácida; CWIN-invertase ácida ligada à parede celular; NTIN-invertase neutra; SPS1-sacarose fosfato sintase; SPS2-sacarose fosfato sintase 2; SPP-sacarose fosfato fosfatase; SNRK-quinase protéica relacionada à não fermentação da sacarose; FRK1-frutoquinase 1; FRK2-frutoquinase; HK1-hexoquinase 1; HK2-hexoquinase 2; G6PI-glicose 6-fosfato isomerase; SUSY-sacarose sintase; TPS-trehalose 6-fosfato sintase; SUT4-transportador de sacarose 4 e GAPDH-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. ** $p < 0,01$ pelo teste de Tukey

O aumento da expressão do transcrito da SPS também foi relacionado ao aumento da atividade da sua enzima (VERMA et al., 2011). Na Figura 17 a SPS1 é a segunda enzima com maior valor de expressão. Provavelmente, a isoforma SPS1 esteja fortemente correlacionada com o aumento do conteúdo de sacarose no colmo da cana. A SPS torna-se progressivamente importante na biossíntese da sacarose a medida que o internó vai amadurecendo (BOTHÁ; BLACK, 2000; VERMA et al., 2011). A expressão da SPS1, ultrapassou o limite de expressão da ACIN, resultando no favorecimento do acúmulo da sacarose. A outra isoforma, SPS2, teve aumento mais discreto, Figura 17 acima. Assim como encontrado por Sugiharto et al. (1997), a isoforma SPS1 também foi mais expressa que a isoforma SPS2 em folhas e colmo da cana. Não há evidências na literatura sobre o efeito acumulativo da atividade enzimática das isoformas da SPS (SUGIHARTO et al., 1997; GROF et al., 2007). A segunda enzima da rota da biossíntese da sacarose, SPP, localizada imediatamente após a etapa da SPS, trabalha retirando o grupo fosfato da sacarose 6-P favorecendo a reação

de síntese (ECHEVERRIA et al., 1997). A expressão relativa da SPP foi intensificada no internó 9 aos 10 meses, contudo, o seu aumento não foi proporcional ao aumento da isoforma SPS1. De certa forma, a SPP é um ponto de controle para a formação da sacarose. A sacarose pode exercer um papel inibitório na enzima que a produz (KOCH, 1996). A atividade mais moderada da SPP possivelmente exerce o controle entre a quantidade final de sacarose e as atividades da SPS1 e SPP, Figura 18.

O trabalho desenvolvido por Zhu e colaboradores (1997) analisou as progênies do cruzamento específico entre *S. officinarum* (altos teores de sacarose) e *S. robustum* (baixos teores de sacarose), e observaram as variações na concentração de sacarose e o comportamento da atividade das principais enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose durante o processo de maturação do colmo para os clones caracterizados como alto e baixo brix. A melhor correlação encontrada pelos autores, comparando os internós dos clones das progênies, foi a correlação entre a concentração de sacarose e a diferença da atividade da SPS e ACIN (SPS-ACIN). O fato da atividade da enzima ACIN ficar no constante limite de hidrólise da sacarose, faz com que esta enzima seja ultrapassada pela atividade da SPS, que realiza a função de síntese da sacarose nos colmos de cana.

Figura 18 - Rota metabólica do metabolismo de carboidrato. Os retângulos indicam as principais enzimas que participam do processo. Adaptado de Dai et al. (2011)

Outra enzima fortemente relacionada ao acúmulo de sacarose nos colmos maduros de cana é a quinase protéica relacionada a não fermentação da sacarose (SNRK). Em plantas, o gene SNRK é compreendido em três subfamílias distintas, SNRK1, SNRK2 e SNRK3, e especificamente em cana-de-açúcar, foram identificados os três membros das subfamílias (ROCHA et al., 2007). Há no mínimo três enzimas biossintéticas relacionadas como substrato para o SNRK, hidroximetilglutaril CoA redutase (HMG CoA redutase), nitrato redutase (NR) e a sacarose fosfato sintase (SPS) (PAPINI-TERZI et al., 2009). Esta última, SPS, em cana-de-açúcar, está fortemente ligada ao acúmulo de sacarose no colmo e inversamente relacionada aos níveis de expressão da SNRK, Figura 17. As subfamílias SNRK 1-2 e mais quatro proteínas 14-3-3 do tipo GF14 apresentaram baixa expressão em internós maduros de cana-de-açúcar, existindo evidências de que a SNRK juntamente com as proteínas 14-3-3 fosforilam e inativam a enzima SPS *in vitro*. (PAPINI-TERZI et al., 2009). O gene SNRK, nas principais plantas cultivadas, está fortemente ligado à restrição da nutrição mineral e estresse abiótico. Quando fosforilada, a enzima SNRK torna-se ativa e atua principalmente, fosforilando e inibindo algumas enzimas diretamente relacionadas ao metabolismo de carboidratos (HRABAK et al., 2003).

A enzima SUSY, que converte a sacarose em UDP-glicose e frutose, é fundamental no processo de acúmulo da sacarose (AMOR et al., 1995; SCHAFER et al., 2005). O mecanismo regulatório da SUSY em plantas sob estresse também é a quinase SNRK, mais especificamente um dos seus membros denominado quinase protéica ligada aos sinais de cálcio (CDPK) (PAPINI-TERZI et al., 2009). Em cana-de-açúcar a diminuição da atividade da CDPK nos internós maduros foi correlacionada com o aumento no teor de sacarose. Desta forma, a diminuição da atividade da CDPK mantém a SUSY ativada, favorecendo a intensificação da força de dreno nos internós maduros (ZRENNER et al., 1995; HANGGI; FLEMING, 2001). A expressão relativa do transcrito do gene da SUSY, Figura 17, aumentou no internó maduro aos 10 meses. A característica principal da superexpressão da SUSY no citossol das células do parênquima em maturação é justamente o estabelecimento do gradiente de fluxo de sacarose para os vacúolos das células de estocagem (KOMOR, 2000; DAI et al., 2011). Quando a sacarose é descarregada no citossol das células de armazenamento a SUSY

cliva esse dissacarídeo. A baixa concentração de sacarose criada no citossol favorece o fluxo de descarregamento do floema nas células de estocagem. Os monossacarídeos gerados são utilizados para a re-síntese da sacarose através das enzimas SPS e SPP, e então a sacarose é enviada para o vacúolo destas células.

A enzima invertase atua hidrolisando a sacarose, produzindo glicose e frutose (FOTOPOULOS, 2005). As três isoformas da invertase ACIN, CWIN e NTIN foram superexpressas no internó 9 das plantas de 10 meses, Figura 17. A principal característica das invertases também é o estabelecimento da força de dreno (KOCH, 2004). O mecanismo que regula o movimento e clivagem da sacarose, em cana-de-açúcar, depende do estágio de maturidade do internó (MOORE, 1995; RAE et al., 2005). Dependendo da rota em que a sacarose entra nas células do parênquima, via plasmodesmatas ou atravessando a parede celular, a sacarose pode ser clivada pelas invertases nos diferentes compartimentos celulares (KOCH, 2004). Para Voster e Botha (1998), a invertase neutra é uma enzima chave que controla diretamente a concentração das hexoses no citossol das células do parênquima do colmo. O controle efetivo sobre esses açúcares reflete sobre a expressão dos genes responsivos à concentração de açúcares (KOCH et al., 1996).

O processo de acúmulo da sacarose em colmo de cana é inteiramente relacionado entre seus intermediários metabólicos (HOEPFNER; BOTHA, 2004). Como as invertases clivam a sacarose, gerando glicose e frutose, as enzimas relacionadas à fosforilação desses monossacarídeos são as hexose-quinases (WIND et al., 2010). A HK pode fosforilar tanto a glicose quanto a frutose, ao contrário da FRK que fosforila somente a frutose (PEGO; SMEEKENS, 2000). Dentre as enzimas relacionadas à fosforilação da glicose e frutose, HK e FRK, apenas a isoforma HK1 apresentou aumento da expressão relativa nas plantas de 10 meses. Os demais transcritos, FRK1, FRK2 e HK2, foram mais expressos nas plantas de 7 meses de idade, Figura 17. A isoforma HK1 foi o transcrito com menor nível de expressão, de acordo com o apresentado na Figura 16-A. A formação da sacarose depende da união da UDP-glicose, produto gerado pela ação da enzima SUSY, e a frutose 6-fosfato, resultado da fosforilação da frutose pela FRK ou HK (UYS et al., 2007).

Outro ponto crucial, bem postulado na literatura, diz respeito aos açúcares sinalizadores, glicose 6-fosfato e frutose 6-fosfato, produtos da ação da HK e FRK (JANG; SHEEN, 1997; HALFORD et al., 1999; PEGO, SMEEKENS, 2000). Como as hexokinases transmitem o sinal ao núcleo da célula é uma questão que ainda permanece sem muitas respostas. Os transportadores de açúcares e quinases/fosfotransferases proteicas são os principais candidatos. Em leveduras, na presença da fosforilação da galactose, GAL 1-P, ativa o fator de transcrição GAL4. A presença de galactose e ATP, a GAL1 forma um complexo com a proteína GAL80, permitindo que GAL4 inicie a transcrição (JANG; SHEEN, 1997).

Outra enzima associada diretamente às HK e FRK é a glicose 6-fosfato isomerase (G6PI). A enzima está associada à formação de glicose 6-fosfato ou frutose 6-fosfato através da atividade de isomerase em uma reação reversível: glicose 6-P $\xleftrightarrow{\text{G6PI}}$ frutose 6-P (UYS et al., 2007). O perfil de expressão apresentado na Figura 17, mostra que nas plantas de 10 meses a G6PI diminui em relação às plantas de 7 meses.

A GAPDH é um importante intermediário da via da glicólise em plantas. Nas canas de 10 meses, a expressão do transcrito da GAPDH reduziu significativamente sua expressão, Figura 17. A redução da expressão do gene da GAPDH é um indicativo de que o metabolismo primário das células do parênquima de estocagem dos internós em amadurecimento está sendo reduzido (GROENEWALD; BOTHA, 2007). Carson e colaboradores (2002) investigando as diferenças de expressão dos genes entre os internós maduros e imaturos de cana observaram que o gene da GAPDH diminui a expressão nos internós maduros. Durante a maturação dos internós há um processo de redirecionamento do esqueleto carbônico dos intermediários que participam da respiração celular, direcionando-os para a rota de biossíntese de sacarose (GROENEWALD; BOTHA, 2008; WACLAWOVSKY et al., 2010). Uma enzima chave nesse processo de redirecionamento do carbono é a frutose-6-fosfato 1-fosfotransferase (PFP). Esta enzima está inversamente correlacionada ao processo de acúmulo de sacarose, desta forma, a redução na atividade da PFP irá promover redução no fluxo do carbono na glicólise e consequentemente beneficiará o processo de síntese de sacarose. Como esta enzima é reversível, o carbono alocado nos

intermediários da rota glicolítica é direcionado no sentido de formar sacarose, processo conhecido como gliconeogênese (GROENEWALD; BOTHA, 2007; WACLAWOVSKY et al., 2010; VAN DER MERWE et al., 2010). A PFP faz parte da glicólise e é responsável em converter frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bisfosfato (GROENEWALD; BOTHA, 2007), Figura 19.

Figura 19 - Parte da rota principal da glicólise. O retângulo em cinza destaca a ação da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Adaptado de Taiz e Zeiger (2004)

Contudo, o presente trabalho não avaliou diretamente o nível de expressão do transcrito do gene da enzima PFP, porém, foi avaliado o nível de expressão do transcrito da GAPDH, passo imediatamente seguinte ao da ação da PFP na glicólise. A redução da expressão apresentada pela GAPDH é forte indicativo da intensificação do processo de gliconeogênese (GLASSOP et al., 2007; GROENEWALD; BOTHA, 2007).

Ainda muito pouco explorado em plantas, o açúcar trehalose foi fortemente vinculado ao processo de acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar no trabalho conduzido por Glassop e colaboradores (2007), avaliando quais os metabólitos mais expressos no meristema apical e internós 4, 7 e 9 em plantas cana com 7 meses de idade. No trabalho os pesquisadores observaram que houve correlação positiva entre

as concentrações de sacarose e de trehalose, especialmente nos internós 7 e 9. A presença da trehalose e trehalose 6-fosfato tem sido vinculada ao mecanismo de “sensoriamento por açúcar” (*sugar-sensing*) (MÜLLER et al., 1999). O mecanismo de síntese e degradação da trehalose, Figura 20 abaixo, foi vinculado ao processo regulatório no controle do influxo dos açúcares participantes da via da glicólise. A inibição da enzima hexoquinase pelo açúcar trehalose 6-fosfato promove a intensificação da gluconeogênese (GODDIJN; VAN DUN, 1999).

A expressão da trehalose 6-fosfato sintase (TPS) avaliada pelo presente trabalho vai de encontro ao discutido anteriormente por Glassop et al. (2007). A expressão relativa do transcrito da TPS aumentou aos 10 meses, comparado às plantas de 7 meses. Possivelmente o produto gerado pela TPS, trehalose 6-fosfato, atue como um inibidor das isoformas das enzimas FRK1, FRK2 e HK2, regulando o processo de influxo dos açúcares intermediários da glicólise. Em levedura, a trehalose e a trahalose 6-fosfato foram vinculadas ao mecanismo regulatório da atividade da hexoquinase (GODDJIN, SMEEKENS, 1998; MÜLLER et al., 1999; AVONCE, 2005). A redução da expressão do transcrito do gene GAPDH, enzima intermediária da glicólise, corrobora com o processo regulatório exercido pelo açúcar trehalose 6-fosfato, vinculando assim a trehalose como um ponto fundamental no processo de acúmulo de sacarose em internós maduros de cana-de-açúcar.

Figura 20 - Reações enzimáticas envolvendo a síntese e degradação da trehalose. Os retângulos coloridos em cinza representam as enzimas relacionadas à síntese da trehalose, os retângulos coloridos em branco representam a parte da rota envolvida com a degradação da trehalose. TPS-trehalose 6-fosfato sintase; TPP-trehalose fosfato fosfatase; GLI-glicose; GLI 1-P-glicose 1-fosfato e GLI 6-P-glicose 6-fosfato

Outro ponto atribuído à função da trehalose em plantas é a participação no processo de resistência a estresses abióticos, por exemplo, a seca. A trehalose pode estabilizar estruturas biológicas desidratadas, como membranas lipídicas ou enzimas presentes no citossol, mais eficientemente que outros açúcares (GODDIJN; VAN DUN, 1999).

Dessa forma, observando as tendências de superexpressão e repressão dos transcritos envolvidos no processo de acúmulo de sacarose no internó maduro de cana, obtivemos o esquema resumido da Figura 21.

Figura 21 - Esquema geral do metabolismo de acúmulo da sacarose no internó 9 de plantas de cana-de-açúcar com 10 meses de idade. O quadrado colorido em azul representa superexpressão dos transcritos e o quadrado vermelho representa repressão dos transcritos. ACIN-invertase ácida; CWIN-invertase ácida ligada à parede celular; NTIN-invertase neutra; SPS1-sacarose fosfato sintase; SPS2-sacarose fosfato sintase 2; SPP-sacarose fosfato fosfatase; SNRK- quinase protéica relacionada à não fermentação da sacarose; FRK1-frutoquinase 1; FRK2-frutoquinase 2; HK1-hexoquinase 1; HK2-hexoquinase 2; G6PI-glicose 6-fosfato isomerase; SUSY-sacarose sintase; TPS-trehalose 6-fosfato sintase; SUT4-transportador de sacarose 4 e GAPDH-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; SAC-sacarose; SAC 6-P-sacarose 6-fosfato; GLI-glicose; UDP-GLI-UDP-glicose; GLI 6-P-glicose 6-fosfato; FRU-frutose; FRU 6-P-frutose 6-fosfato

Os genes diretamente envolvidos no metabolismo de carboidrato não são abundantes nos colmos de cana-de-açúcar, foi a conclusão que chegou Casu et al. (2003). Os autores avaliaram um total de 8.324 ESTs obtidos do colmo maduro e imaturo de cana-de-açúcar, 7.242 ESTs de internós maduros 6 ao 11 e 1.082 ESTs de internós imaturos 1 e 2, respectivamente. Do total de ESTs alinhados com banco público, 53,80% foram identificados como genes homólogos que codificam proteínas, o restante, 46,20%, não encontrou nenhuma homologia. Para a porção dos ESTs que apresentaram alta homologia com os bancos de dados, as funções envolvidas no metabolismo de carboidratos, como síntese, modificações ou quebra da sacarose, representaram apenas 2,1% e 2,4% para os internós imaturos e maduros, respectivamente. Casu et al. (2003) discute ainda que os transcritos dos genes que codificam alguma função diretamente envolvida com a acumulação de carboidrato não são abundantes, mesmo em internós maduros em processo de maturação. As funções mais comumente observadas na coleção de ESTs dos internós maduros corresponderam aos transportadores de hexose, seguido do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), β -glucanases, celulose sintase, PPi:frutose 6-fosfato 1-fosfotransferase (PFP), frutose bisfosfato aldolase, trehalose 6-fosfato sintase, enolase, UDP-glicose desidrogenase (UDPGH), sacarose sintase e triosefosfato isomerase (CASU et al., 2003).

5.3 Proteoma comparativo entre os internós maduros de colmos de cana-de-açúcar com 7 e 10 meses de idade

Na tentativa de entender melhor o processo de acúmulo de sacarose em colmos maduros de cana-de-açúcar, o presente trabalho visou unir duas ferramentas poderosas, transcrito e proteoma, a fim de conhecer melhor os processos gênicos, bioquímicos e fisiológicos envolvidos na maturação do colmo de cana. No item anterior, pudemos ter idéia de como os genes envolvidos no processo de quebra e re-síntese da sacarose são expressos à medida que a planta muda de estágio de desenvolvimento, passa do crescimento vegetativo para o estágio de maturação e acúmulo de açúcares. Já neste ponto do trabalho, vamos avaliar os mesmos tecidos, agora do ponto de vista

do proteoma, avaliando principalmente as proteínas preferencialmente expressas e diferencialmente expressas nos l9 das plantas de 7 e 10 meses de idade.

5.3.1 Extração das proteínas

Para um bom resultado de gel bi-dimensional (2D-PAGE), em termos de quantidade, qualidade e bom padrão de distribuição de proteínas, o método de extração é importante. A extração de proteínas dos tecidos de plantas é particularmente complicada, devido principalmente à presença de contaminantes como ácidos orgânicos, lipídios, polifenóis, pigmentos, terpenos, entre outros (AMALRAJ et al., 2010).

Foram conduzidas três extrações de proteínas independentes, com três plantas por extração. Os *pellets* gerados das extrações foram ressuspensos independentemente e misturados no final do processo em um único tubo. De acordo com Karp et al. (2005) e Diz et al. (2009), este procedimento é extremamente válido e potencialmente avaliável. Realizando esse agrupamento das amostras podemos reduzir a variação biológica, aumentando assim a sensibilidade para detectarmos diferenças entre os tratamentos. Outra vantagem dessa metodologia é que podemos analisar um grande número de amostras em menor tempo e com menor consumo de material, gerando menos resíduos.

O método de extração fenólico empregado no tecido de estocagem do internó 9 das plantas de 7 e 10 meses de idade promoveu uma boa extração das proteínas, permitindo a visualização através do gel poliacrilamida desnaturante, Figura 22 abaixo, uma mistura complexa de proteínas sem degradação ou sinais de contaminantes. Amalraj e colaboradores (2010) trabalharam com amostras de colmos de cana com 5 meses de idade, comparando métodos de extração de proteínas, os autores observaram que o método que utiliza fenol foi o que obteve maior concentração de proteínas e também, o que permitiu a detecção de maior número de spots em gel 2D-PAGE (pH 4-7).

Figura 22 - Gel desnaturante de poliacrilamida (12,5%) carregado com amostra de proteínas totais extraída com fenol do tecido de estocagem dos internós maduros de colmo de cana-de-açúcar com 7 e 10 meses. 7m I9-internó número 9 de plantas de 7 meses; 10m I9-internó número 9 de plantas de 10 meses; M-marcador de peso molecular; kDa-kilodaltons

5.3.2 Géis bi-dimensionais de poliacrilamida (2D-PAGE) dos internós maduros (I9) de 7 e 10 meses de idade

O padrão de expressão das proteínas foram comparados entre os internós 9 de 7 meses com os internós 9 de 10 meses, levando em consideração que o internó 9 de 7 meses foi utilizado como controle para a análise das imagens. Para o processo de focalização, bem como a eletroforese de segunda dimensão, as triplicatas de cada tratamento foram realizadas juntas. O padrão de expressão das proteínas de ambos os materiais, basicamente, concentrou-se na faixa de pH compreendido entre 5-7, Figura 23.

Figura 23 - Géis bi-dimensionais desnaturante de poliacrilamida (12,5%) montados em triplicata e corados com corante coloidal *Coomassie Blue G-250*. O material utilizado foi tecido do parênquima de estocagem dos internós maduros de colmo de cana-de-açúcar com 7 e 10 meses. O conjunto de seta no canto superior esquerdo indica a direção da separação do extrato de proteína total. Seta na horizontal, separação das proteínas com base no ponto isoelétrico das proteínas (pH 4-7 utilizado), seta na vertical separação das proteínas com base no peso molecular (PM). 7m I9-internó número 9 de plantas de 7 meses; 10m I9-internó número 9 de plantas de 10 meses

5.3.3 Análise das imagens dos géis 2D-PAGE

Através do programa de análise de imagens foi possível identificar e quantificar os *spots* presentes em cada gel das triplicatas. Houve diferenças no número de *spots* identificados para cada tratamento. Aos 7 meses de idade o internó 9 metaboliza os açúcares glicose e frutose e acumula baixos teores de sacarose. Aos 10 meses de idade, há inversão nas concentrações de açúcares presentes no tecido de estocagem, o parênquima passa a acumular elevados teores de sacarose. Essa diferença de acúmulo de sacarose influencia a expressão das proteínas presentes no parênquima de estocagem do colmo da cana. O elevado potencial osmótico gerado pelo acúmulo de solutos, principalmente a sacarose, somado ao período obrigatório de restrição hídrica a

que as plantas são submetidas, gera sinais no corpo da planta que alteram a expressão do proteoma.

Na média dos tratamentos, foram detectados 339 *spots* para os géis das plantas de 7 meses e 298 *spots* para os géis das plantas de 10 meses, Figura 24 abaixo. As triplicatas dos tratamentos foram alinhadas e sobrepostas para fins comparativos. Na comparação entre idades, o programa de análise de imagem detectou 419 *spots* total, dentre esses, 223 foram significativos pelo teste *t* ($p < 0,05$). Entre os *spots* estatisticamente significativos, 63 *spots* são diferencialmente expressos entre as idades, 44 *spots* foram preferencialmente expressos para 10 meses e 50 *spots* foram preferencialmente expressos para 7 meses. Os 66 *spots* restantes ou não foram recortados dos géis ou então não foram identificados pela espectrometria de massas.

Figura 24 - Imagem de detecção dos *spots* dos géis de referência gerada pelo programa *Image Master Platinum v.7.0*, destacando as faixas de pH na parte superior de cada gel e as marcas internas acrescentadas para facilitar o alinhamento entre os tratamentos, análise de classes. A imagem da esquerda é referente ao internó número 9 com 10 meses e a imagem da direita é referente ao internó número 9 com 7 meses

Tabela 6 - Estatística do alinhamento intra-específico das replicatas, separadamente, dos internós número 9 nas idades de 10 e 7 meses. Ref.-gel de referência; r-replicata; r^2 -coeficiente de correlação

Tratamentos	nº spots no gel	% de alinhamento	r^2 (relação a ref.)
10m I9 ref.	284	88	
10m I9 r.1	276	82	0,9451
10m I9 r.2	270	89	0,9562
7m I9 ref.	324	67	
7m I9 r.1	314	64	0,9161
7m I9 r.2	294	73	0,9066

Tabela 7 - Estatística do alinhamento inter-específico das replicatas dos internós número 9 nas idades de 10 e 7 meses. Todos alinhamentos foram com base em gel virtual gerado pelo programa *Image Master 7.0 Platinum*. r-replicata; r^2 -coeficiente de correlação

Tratamentos	nº spots no gel	% de alinhamento	r^2 (relação ao gel virt.)
10m I9 r.1	298	93	
10m I9 r.2	276	82	0,9451
10m I9 r.3	270	89	0,9562
7m I9 r.1	333	68	0,881
7m I9 r.2	314	64	0,8047
7m I9 r.3	295	73	0,7907

5.3.4 Busca das proteínas nos bancos de dados

Os espectros gerados pelo equipamento de espectrometria de massas foram processados pelo programa *ProteinLynx Global Server*, o qual gera os arquivos especificamente formatados para a utilização. A interface de pesquisa e identificação das proteínas, com os arquivos formatados, foi realizada com o programa *MASCOT Server* (<http://www.matrixscience.com>), licença adquirida. O banco de dados utilizado para identificação das proteínas foi o banco do SUCEST-FUN (<http://www.sucest-fun.org>) (VETORE et al., 2003), banco este utilizado localmente, uma vez que as sequências foram depositadas em um servidor presente em nosso laboratório. Os parâmetros pré-fixados para análise foram de acordo com as especificações do equipamento, ESI-Q-TOF-MS/MS, e parâmetros decorrentes das proteínas provenientes de geis 2D-PAGE utilizando a digestão com tripsina. Os resultados das buscas geraram uma nota (score) para cada acesso. Essa nota é referente à

probabilidade de cada peptídeo presente no espectro do MS/MS ser um evento aleatório. Scores são dados por $-10 \cdot \log(P)$, onde P é a probabilidade de uma proteína encontrada (*match*) ser um evento aleatório, os scores acima de 70, ou seja, com *e-value* de 10^{-7} , são considerados eventos com 95% de probabilidade de ser a proteína encontrada (PERKINS et al., 1999).

Cada sequência de proteína retornada do programa *MASCOT Server* era identificada por um *contig* (por exemplo, SCJFST1014C03.g). Os eventos significativos, score acima de 70, foram inseridos na página de pesquisa do site SUCEST-FUN, então, como resultado obtivemos o nome da proteína e sua respectiva categoria funcional.

5.3.5 Categorias funcionais das proteínas identificadas dos internós maduros (I9) de colmo de cana-de-açúcar

Os chamados grupos de sequências montadas de cana-de-açúcar, SAS (*Sugarcane Assembled Sequences*), foram categorizados de acordo com a funcionalidade dos genes anotados com base em outros organismos. As categorias foram geradas ou automaticamente através da ferramenta BLASTX dos SAS contra bancos de dados já categorizado ou então por inspeção manual dos alinhamentos do BLASTX. As sequências foram agrupadas em 18 categorias de relativa importância biológica (VETTORE et al., 2003).

Os 157 *spots* recortados dos géis, 63 diferencialmente expressos Tabela 8, 44 e 50 preferencialmente expressos para 10 e 7 meses Tabelas 9 e 10, respectivamente, geraram 233 proteínas identificadas. Do total de proteínas identificadas, 81 acessos geraram um único *hit*. O restante, 152 acessos, geraram dois ou três *hits*. O principal problema com acessos com mais de um *hit* é o fato de não afirmarmos efetivamente qual a proteína que está contribuindo para a variação da expressão no gel 2D-PAGE. Eventualmente, os géis 2D-PAGE podem apresentar mais de uma proteína por spot, e pela seletividade e especificidade da técnica da espectrometria de massas, mais de uma proteína pode ser identificada.

Metabolismo de aminoácido

Bioenergia

174	Phosphoglucomutase, cytoplasmic 2 (EC 5.4.2.2) (Glucose phosphomutase 2)	SCJFST1014C03.g	Zea mays	NP_001105406	406	25031/4,68	52/5,58	1,51	R.SMPTSAALDVVAK.N
-----	--	-----------------	----------	--------------	-----	------------	---------	------	-------------------

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses

									(continuação)
Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp (kDa)	Razão10m/7m (p<0,05)	Peptídeos
									K.EDFGGGHPDPNLTYAK.E K.SSSNVEPPEFGAAADGDADR.N K.HIFVEELGADESSLNCPK.E K.SSSNVEPPEFGAAADGDADRNMILGK.R + Oxidation (M) R.FFVTPSDSVAIIAANAVQSIPYFASGLK.G
189	Aconitate hydratase, cytoplasmic (EC 4.2.1.3)	SCSGFL1079E02.g	Arabidopsis thaliana	AAD25640	606	23508/9,69	75/5,08	1,49	R.ILLESAIR.N K.LAEIPFKPAR.V K.LAEIPFKPAR.V K.FYSLPALNDPR.I R.VLLQDFTGVPVVDLAAMR.D K.INPLVPVDLVIDHSVQVDVAR.S
200	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplast precursor (EC 1.18.1.2)	SCSFAD1112B06.g	Zea mays	NP_001105568	251	23215/8,55	19/6,30	3,03	R.LVYTNEAGEIVK.G R.LYSIASSALGDFGDSK.T K.GVCNFCDLKPGADVQITGPVGK.E
Comunicação celular e transdução de sinais									
140	S-adenosylmethionine synthetase 1 (EC 2.5.1.6) (Methionine adenosyltransferase 1)	SCAGLV1039H05.g	Zea mays	ACG42196	1307	27244/4,89	38/5,65	0,28	K.TIFHLNPSGR.F K.TNMVMVFGEITTK.A K.TNMVMVFGEITTK.A + Oxidation (M) R.NIGFVSADVGLDADHCK.V K.EHVIKPIPEQYLDEK.T K.LCDQVSDAVLDAEDPDSK.V K.VLVNIEQQSPDIAQGVHGHFTK.R K.VLVNIEQQSPDIAQGVHGHFTK.R R.VHTVLISTQHDETVDNDEIAADLK.E K.RPEEIGAGDQGHMFGYATDEPELMPLSHVLATK.L K.RPEEIGAGDQGHMFGYATDEPELMPLSHVLATK.L + Oxidation (M) K.RPEEIGAGDQGHMFGYATDEPELMPLSHVLATK.L + 2 Oxidation (M)

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses

(continuação)

Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Razão10m/7m (p<0,05)	Peptídeos
198	Glutamic-acid and lysine rich protein	SCCCLB2008E03.g	Zea mays	ADV56677	356	23992/8,76	29/5,20	2,09	K.VAPFIPEEPK.A K.SGTTPLSPAITFILDK.V K.VAPFIPEEPKAEPAAAEATSR.E K.KEEAEPTAAAATEEAAPAPATPSEPAAEEK.R
213	14-3-3-like protein	SCJFRT1008E09.g	Saccharum hybrid cultivar	AAP48904	2800	34524/5,32	54/5,19	0,006	R.IVSSIEQK.E R.EENVYMAK.L K.DSTLIMQLLR.D K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation (M) K.ESAESTMVAYK.A R.KNEEHVNLK.E R.KNEEHVNLK.E R.YEEMVEYMEK.V R.YEEMVEYMEK.V + Oxidation (M) R.YEEMVEYMEK.V + 2 Oxidation (M) R.IVSSIEQKEESR.K R.IVSSIEQKEESR.K K.TVDVEELTVEER.N K.IEAELSNICDGILK.L K.LLDShLVPSTAAESK.V K.LLDShLVPSTAAESK.V R.GKIEAELSNICDGILK.L R.GKIEAELSNICDGILK.L K.AAQDIALAELAPTHPIR.L K.AAQDIALAELAPTHPIR.L K.QAFDEAISELDTLGEESYK.D K.LAEQAERYEEMVEYMEK.V K.LAEQAERYEEMVEYMEK.V + Oxidation (M) K.QAFDEAISELDTLGEESYKDSTLIMQLLR.D K.QAFDEAISELDTLGEESYKDSTLIMQLLR.D + Oxidation (M) K.QAFDEAISELDTLGEESYKDSTLIMQLLR.D + Oxidation (M)

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses

(continuação)

Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp (kDa)	Razão10m/7m (p<0,05)	Peptídeos
8	Translational elongation factor Tu	SCCART2004E05.g	Zea mays	NP_001150410	1311	26301/4,95	37/5,54	0,72	K.FEAVVYVLK.K K.VGDTV DIVGIR.D K.ALEALMANPALK.R K.ALEALMANPALK.R + Oxidation (M) R.GDNEWVDYIFK.L R.TCTVTGVEMFQK.T K.LVDEV DNYIPVQR.Q K.TMDAMAGDNVGLLR.G + 2 Oxidation (M) K.DMVDDEELLELDLEVR.E K.DMVDDEELLELDLEVR.E + Oxidation (M) R.QTDLPFLAVEDVFSITGR.G R.ELLSNYEYDGEVPIIAGSALK.A R.ELLSNYEYDGEVPIIAGSALK.A
39	Nucleoside diphosphate kinase I (EC 2.7.4.6)	SCRLSD1010G11.g	Lolium perenne	AF271362_1	405	19179/6,23	6/6,77	2,58	K.KGFYLK.G R.GLIGDIISR.F R.GDYAVEVGR.N K.SNLHPWIYEA.- R.IIGATRPWEASPGTIR.G R.IIGATRPWEASPGTIR.G
156	Tubulin beta chain	SCEZFL4046D04.g	Populus trichocarpa	XP_002307960	1369	29408/5,87	44/5,91	0,57	K.IREEYPDR.M R.INVYYNEASGGR.F R.MMLTFSVFPSPK.V R.MMLTFSVFPSPK.V + Oxidation (M) R.MMLTFSVFPSPK.V + 2 Oxidation (M) R.AVLMDLEPGTMDSVR.S R.AVLMDLEPGTMDSVR.S + 2 Oxidation (M) R.EILHIQGGQCGNQIGAK.F R.EILHIQGGQCGNQIGAK.F K.FWEVICDEHGIDATGR.Y K.GHYTEGAELIDSVLDVVR.K K.GHYTEGAELIDSVLDVVR.K

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses

(continuação)

Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp (kDa)	Razão10m/7m (p<0,05)	Peptídeos
212	Vacuolar ATP synthase subunit B isoform 1 (EC 3.6.3.14)	SCJLFL4101G01.g	Zea mays	NP_001152665	397	30749/5,25	25/4,79	2,73	K.TPVSLDMLGR.I R.TVSGVAGPLVILDK.V K.YTTVQFTGEVLK.T K.AVVQVFEGTSGIDNK.Y K.IPLFSAAGLPHNEIAAQICR.Q
217	Tubulin beta-7 chain	SCJLHR1025F02.g	Zea mays	ACG35721	1182	23972/5,45	374,91	0,14	K.LAVNLIPFPR.L R.FPGQLNSDLR.K R.MMLTFSVFPSPK.V R.MMLTFSVFPSPK.V + Oxidation (M) R.MMLTFSVFPSPK.V + 2 Oxidation (M) K.GHYTEGAELIDAVLDVVR.K K.GHYTEGAELIDAVLDVVR.K K.GHYTEGAELIDAVLDVVR.E K.LTNPSFGDLNHLISATMSGVTCCLR.F K.EAENCDCQLQGFQVCHSLGGGTGSGMGTLISK.I K.EAENCDCQLQGFQVCHSLGGGTGSGMGTLISK.I + Oxidation (M)
Metabolismo de nucleotídeo									
21	Probable ATP synthase 24 kDa subunit, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)	SCJFST1009B11.g	Triticum aestivum	AAT36616	942	26466/9,40	24/6,04	0,33	K.FETALGVLK.K K.YTIETFK.G K.KFETALGVLK.K R.TYLNLTQQIR.I K.NMATLLAEFDK.I K.IEEEELEIAK.S K.ITIDPDDPAVSR.Y K.EKITIDPDDPAVSR.Y K.SGLIDHLGIEPLMMEALEK.I K.SGLIDHLGIEPLMMEALEK.I + Oxidation (M) K.SGLIDHLGIEPLMMEALEK.I + 2 Oxidation (M)

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses

									(continuação)
Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp (kDa)	Razão10m/7m (p<0,05)	Peptídeos
Metabolismo de proteína									
45	Translation initiation factor 5A (eIF-5A)	SCCCLR1C02A02.g	Zea mays	NP_001105606	340	29242/8,64	9/5,36	1,73	R.LPTDETLVAQIK.E K.LEDIVPSSHNCIPHVNR.T K.KLEDIVPSSHNCIPHVNR.T
66	Proteasome subunit beta type 2 (EC 3.4.25.1) (20S proteasome alpha subunit D)	SCRFHR1006A12.g	Triticum aestivum	AAU82106	121	26718/5,80	20/5,54	1,28	R.VQFTEFIQK.N R.LVVAPQNFVIK.I R.NTIPLSTAAANFTR.G
79	20S proteasome beta subunit PBB1 (EC 3.4.99.46)	SCSFAD1125D01.g	Zea mays	ACG36096	75	29157/9,47	23/6,41	2,45	R.VITALTLK.S R.EEGIELVSDAIR.A
163	RuBisCO subunit binding-protein beta subunit, chloroplast precursor	SCVPLB2088B01.g	Zea mays	AAT90346	154	23002/4,88	49/5,55	2,66	R.DLINVLEEAIR.G R.GYISPYFVTDSEK.M R.GAYPILIIAEDIEQEALATLVVNK.L
186	Heat shock protein 82	SCJLST1027G10.b	Triticum aestivum	AAD11549	354	28578/7,81	65/5,05	0,67	K.GYEVLYMVDAIDEYAIGQLK.E K.KGYEVLYMVDAIDEYAIGQLK.E K.DLVMLLFETALLTSGFSLDDPNTFGSR.I + Oxidation (M)
Proteínas de reserva									
69	Ferritin	SCSGLV1007H10.g	Zea mays	CAA43663	171	21882/5,90	21/5,32		K.GELALVPQTPDK.S K.GDALYAMELALALEK.L + Oxidation (M) K.EVLSGVVFQPFEEIK.G
201	Multicatalytic endopeptidase complex, proteasome precursor, beta subunit (EC3.4.99.46)	SCJFST1009D05.b	Zea mays	ACG36246	1137	26214/6,25	54/5,37	1,83	K.ITQLTDNVVYVCR.S

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses

									(continuação)
Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp (kDa)	Razão10m/7m (p<0,05)	Peptídeos
									K.NMLQAGMIVGGWDK.Y + Oxidation (M) K.NMLQAGMIVGGWDK.Y + 2 Oxidation (M) R.SGSAADTQVISDYVR.Y K.EGMSQEEAEKFVVK.V K.YEGGQIFSVPLGGTILK.Q R.ASDKITQLTDNVYVCR.S K.QPFAIGSGSSYLYALLDHEWK.E K.LPLWHDELEPHNSLLDILAAGNPDPMVQ.- K.LPLWHDELEPHNSLLDILAAGNPDPMVQ.- + Oxidation (M) R.NFYPGDKLPLWHDELEPHNSLLDILAAGNPDPMVQ.- + Oxidation (M)
Resposta ao estresse									
64	Disease resistance response protein 206	SCEPLB1041C06.g	Zea mays	NP_001149569	211	21466/6,82	19/6,48	2,82	K.LYFHDIVAGTSSPTAVR.I R.NEVLSDIREMSIVGGSGK.F + Oxidation (M) K.GYVQAHTIDSGATSGETVVQYTVNVK.V
67	Superoxide dismutase [Mn] 3.4, mitochondrial precursor (EC 1.15.1.1)	SCJFRT1009A12.g	Saccharum officinarum	ACT53877	991	25971/6,78	20/6,32	2,12	K.ALEQLDAAVAK.G K.GDASAVVQLQGAIK.F K.NVRPDYLNNIWK.V K.NVRPDYLNNIWK.V K.LSVETTANQDPLVTK.G K.LGWAIDEDFGSFEALVK.K K.GASLVPLLGDVWEHAYYLQYK.N
90	Isoflavone reductase homolog IRL (EC 1.3.1.-)	SCCCST2003G12.g	Zea mays	NP_001150952	848	24014/8,58	26/5,46	1,50	K.SFQDAGVTLLK.G K.ILVVGGTGYLGR.H R.FFPSEFGLDVDR.T K.GDLYDQASLVSAVK.G R.ATEAAGIPYTVVSAGYFAGFALPSIGQQLAQGPPTDK.A
109	Caffeic acid 3-O-methyltransferase (EC 2.1.1.68)	SCCCST3C07C04.g	Saccharum hybrid cultivar	AAQ67347	924	25096/4,96	32/5,51	2,15	K.NHSVIITK.K R.LLASVDVVK.C

Tabela 8 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses

<i>Spot</i>	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp (kDa)	Razão10m/7m (p<0,05)	(conclusão) Peptídeos
									K.DAVLDGGIPFNK.A
									K.VLMESWYYLK.D
									K.VLMESWYYLK.D + Oxidation (M)
									R.LPVAPTNPDAADMVDR.M
									R.LPVAPTNPDAADMVDR.M + Oxidation (M)
									K.AYGMTAFEYHGTDPR.F + Oxidation (M)
									K.NALELGLLEVLQAEAPAGK.A
									K.NALELGLLEVLQAEAPAGK.A

Tabela 9 - Proteínas preferencialmente expressas dos internós maduros I9 de 10 meses

(continua)

Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp (kDa)	Peptídeos
Metabolismo de aminoácido								
2107	Cysteine proteinase 2 precursor (EC 3.4.22.-)	SCRLLV1024D02.g	Zea mays	NP_001105479	395	18936/4,55	24/4,75	K.NSWGADWGDGYFK.M K.YNGGLDTEESYPYK.G K.GVNGICDFKPVGVK.V
2109	Cysteine proteinase 2 precursor (EC 3.4.22.-)	SCRLLV1024D02.g	Zea mays	NP_001105480	112	18936/4,55	24/4,65	K.YNGGLDTEESYPYK.G K.GVNGICDFKPVGVK.V
Bioenergia								
2091	Formate dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.2.1.2)	SCCCLR1C02A03.g	Zea mays	ACG39798	235	28531/6,28	37/6,79	K.AGEYADKNPNFVGCVEGALGIR.G R.NFLPGYQQVQGEWNVAGIAHR.A
2102	ATP synthase delta' chain, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)	SCCCAM2097A07.g	Zea mays	NP_001147558	520	30167/5,85	19/4,69	K.LTVNFVLPYK.S K.LGSASTDLEKAEAQIGVDVHSALNAALTG.- K.VAPNIEPPTTPLSLMQPRPPTPATIPTK.L K.VAPNIEPPTTPLSLMQPRPPTPATIPTK.L + Oxidation (M) K.EVDMVIVPATTGQMGLVLPGHVATIAELKPGVLSVHEGNDVTK.Y + 2 Oxidation (M)
2120	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47) (O-acetylserine sulfhydrylase)	SCSGAD1144C11.g	Zea mays	NP_001105469	334	22933/8,71	28/5,98	R.YLSSVLFQSIK.K K.LFVVVFPSFGER.Y K.IDALVSGIGTGGTITGTGR.Y K.THNSYILQQFENPANPK.I K.IQGIGAGFIPGVLDVDLLDETQISSDEAIETAK.S

Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Peptídeos
2130	Phosphoglycerate kinase, cytosolic (EC 2.7.2.3)	SCQGRT1042D04.g	Gossypium hirsutum	ACJ11718	54	21828/4,79	35/5,94	K.GVSLLLPTDVVVADK.F K.GVTTIIGGSDSVAAVEK.A
2138	Beta-amylase (EC 3.2.1.2) (1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase)	SCQGSD2048B10.g	Zea mays	AAD15902	113	28440/9,36	47/4,84	R.VSDELFEGDNYTTFK.T K.SAPEELVQQVLSAGWR.E R.SKPEIPIEEILEVAQPR.L
Dinâmica celular								
2092	CHP-rich zinc finger protein-like	SCVPRZ2043A12.g	Oryza sativa	BAC65369	215	24230/4,84	33/4,77	R.LGLSAMIMGSR.G + Oxidation (M) R.LGLSAMIMGSR.G + Oxidation (M) R.LGLSAMIMGSR.G + 2 Oxidation (M) K.AQDLAQPLVDAQIPFK.I R.YPDDAAGAGGDAAGATDELHTVPEDEPVYHDAPEVQK.D
2100	Thioredoxin H	SCJFHR1C06E10.b	Zea mays	ACG24509	747	21498/4,94	10/4,58	K.FPNVVFLK.V K.KFPNVVFLK.V R.TIAPIFADMAK.K R.TIAPIFADMAK.K + Oxidation (M) K.TIAEQFSVEAMPTFLFMR.E K.TIAEQFSVEAMPTFLFMR.E + Oxidation (M)
Metabolismo do DNA								
2122	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	SCCCLB1021H03.g	Persea americana	ADA70357	412	25862/4,84	28/4,66	K.DLSSIGDTVVISVTK.E K.FSTSGEIGSANIVCR.Q K.LMDIDSEHLGIPDSEYQAIVR.M K.LMDIDSEHLGIPDSEYQAIVR.M + Oxidation (M)
Metabolismo do nitrogênio, sulfato e fosfato								

Tabela 9 - Proteínas preferencialmente expressas dos internós maduros I9 de 10 meses

(continuação)

Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp (kDa)	Peptídeos
2105	Soluble inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) (Pyrophosphate phospho-hydrolase)	SCJFST1010C07.g	Zea mays	NP_001104889	409	26340/5,81	23/5,74	K.IIAVCADDPEYR.H R.HYNDISELSPHR.L K.EVAVDAFLPATTRS.E R.VLYSSVVYPHNYGFIPR.T R.TLCEDNDPMDVLVLMQEPVIPGSFLR.A + 2 Oxidation (M)
Crescimento e desenvolvimento vegetal								
2128	Late embryogenesis-like protein	SCCST1C05A11.g	Glycine max	ACJ31819	123	25074/5,06	32/4,87	K.IPVSLVFDDIK.S K.VKDFIHDIGEK.I K.NPNPVIPLVDIDYLDSDGRK.L
Metabolismo de proteínas								
2096	Heat shock protein 17.2	SCCCLR1C06F08.g	Zea mays	ACG24656	446	31082/9,03	8/6,43	K.ETPEAHVFK.A K.AALENGVLTVTVPK.A K.VEVEDGNVLVISGQR.S R.SIVPSASSTDSETAAAFANAR.I R.SNVFDPFSMDLWDPFDNMFR.S R.SNVFDPFSMDLWDPFDNMFR.S + Oxidation (M)
2098	Heat shock protein 16.9	SCCART2C06B12.g	Zea mays	ACG24656	222	24946/7,96	8/5,51	K.AALENGVLTVTVPK.A R.SIVPSASGDSETAAAFANAR.I R.SSVFDPFSLDLWDPFDNMFR.S + Oxidation (M)
2099	Heat shock protein 16.9	SCJLRT1016D06.g	Zea mays	ACG24656	677	25004/6,26	8/5,80	K.AGLENGVLTVTVPK.A K.VEVEDGNVLVISGQR.C R.SIVPSASGDSETAAAFANAR.I R.SSVFDPFSLDLWDPFDNMFR.S + Oxidation (M)
2111	Cysteine protease component of protease-inhibitor complex	SCCCSD1C01G12.g	Zea mays	NP_001148706	1268	27031/7,72	26/4,58	K.CGIAVEPSYPLK.E K.NSWGSSWGEGYIR.M K.VVTIDSYEDVPANSEK.S K.CGTALDHGVTAVGYGTENGK.D

Tabela 9 - Proteínas preferencialmente expressas dos internós maduros l9 de 10 meses

								(continuação)
Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Peptídeos
								K.AVANQPVSVIAIEAGGSFQLYSSGIFTGK.C
2134	Cytosol aminopeptidase (EC 3.4.11.1) (Leucine aminopeptidase)	SCEQSD1076C11.g	Arabidopsis thaliana	XP_002880560	231	24368/5,24	43/5,57	K.GLTFDSGGYNIK.T R.LTLADALVYACNQGVK.I K.IASTYSDVFTATILDVEK.C
2139	Protein disulfide isomerase precursor (PDI) (EC 5.3.4.1)	SCSFSD1066A11.g	Zea mays	NP_001105755	264	25502/4,74	49/4,94	K.SVYSAAAEFQNK.E K.LAPVLEEAAATLLSDEEVVIK.M K.LAPVLEEAAATLLSDEEVVIK.M
2140	Protein disulfide isomerase precursor (PDI) (EC 5.3.4.1)	SCJLFL4097E04.g	Zea mays	NP_001105755	1242	23454/4,79	51/4,95	R.TADDIVDFIK.K K.SVYSAAAEFQNK.E K.SEPIEVNNEPVK.V K.FLIGDIEASQGAQYFGLK.E K.LAPVLEEAAATLLSDEEVVIK.M K.LAPVLEEAAATLLSDEEVVIK.M
2141	Protein disulfide isomerase precursor (PDI) (EC 5.3.4.1)	SCJLFL4097E04.g	Zea mays	NP_001105755	316	28678/7,15	51/4,91	R.TADDIVDFIK.K K.EDQTPILIQDGDGSK.K K.FLIGDIEASQGAQYFGLK.E K.LAPVLEEAAATLLSDEEVVIK.M K.LAPVLEEAAATLLSDEEVVIK.M
2147	Heat shock protein 70	SCEQLB2017F03.g	Triticum aestivum	AAB99746	285	25572/6,86	56/5,34	K.DAGVIAGLNVMR.I + Oxidation (M) R.TTPSYVAFTDTER.L R.IINEPTAAAIYGLDK.K R.IINEPTAAAIYGLDKK.A
2148	Protein disulfide isomerase precursor (PDI) (EC 5.3.4.1)	SCVPFL1133F11.g	Zea mays	NP_001105755	406	26695/5,30	57/4,90	R.SLPTLVLIGPDGK.T K.MPWLAIPQGDQK.C + Oxidation (M) R.GIPSLVAIGPTGQTVSR.D K.AQLMIHGADAFPFTEER.L + Oxidation (M)

Tabela 9 - Proteínas preferencialmente expressas dos internós maduros I9 de 10 meses

								(continuação)
Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Peptídeos
								R.NQSSFDDFFSEMPWLALPLEDERK.T + Oxidation (M) K.TLNSNVADIIDDHGFEAWEGFPFSAEK.L
2150	Protein disulfide isomerase precursor (PDI) (EC 5.3.4.1)	SCCART1C05D06.g	Zea mays	NP_001105755	290	25221/4,50	58/4,85	R.SLPTLVLIIGPDGK.T K.MPWLAIPQGDQK.C K.MPWLAIPQGDQK.C + Oxidation (M) R.GIPSLVAIGPTGQTVSR.D K.AQLMIHGADAFPTEER.L + Oxidation (M)
2151	Luminal binding protein 2 precursor (BiP2) (Heat shock protein 70 homolog 2)	SCSBFL4065H10.g	Zea mays	NP_001105893	625	24803/7,97	58/5,25	K.DAGVIAGLNVAR.I K.VFSPEEISAMILGK.M + Oxidation (M) R.IINEPTAAAIAYGLDK.K R.IINEPTAAAIAYGLDKK.G R.VEIESLFDGTDGSEPLTR.A
2152	Protein disulfide isomerase precursor (PDI) (EC 5.3.4.1)	SCSFSB1070E02.g	Zea mays	NP_001105755	545	22913/5,09	58/4,83	R.SLPTLVLIIGPDGK.T K.MPWLAIPQGDQK.C K.MPWLAIPQGDQK.C + Oxidation (M) K.TLNSNVADIIDEHGFEAWEGFPFSAEK.L
2153	Heat shock protein 70	SCJLRT2049E04.b	Triticum aestivum	ADD23344	173	32692/9,51	62/4,83	R.IAGLEVLR.I K.AVITVPAYFNDSQR.T R.IINEPTAASLAYGFEK.K
Proteínas de reserva								
2167	Proteasome subunit beta type 6 precursor (EC 3.4.25.1)	SCJFST1009D05.b	Zea mays	ACG36246	1137	26214/6,25	6/5,09	K.ITQLTDNVYVCR.S K.NMLQAGMIVGGWDK.Y + Oxidation (M) K.NMLQAGMIVGGWDK.Y + 2 Oxidation (M) R.SGSAADTQVISDYVR.Y K.EGMSQEEAEKFVVK.V K.YEGGQIFSVPLGGTILK.Q R.ASDKITQLTDNVYVCR.S

Tabela 9 - Proteínas preferencialmente expressas dos internós maduros 19 de 10 meses

								(conclusão)
Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Peptídeos
								K.QPFAIGGSGSSYLYALLDHEWK.E K.LPLWHDELEPHNSLLDILAAGNPDPMPVQ.- K.LPLWHDELEPHNSLLDILAAGNPDPMPVQ.- + Oxidation (M) R.NFYPGDKLPLWHDELEPHNSLLDILAAGNPDPMPVQ.- + Oxidation (M)
Resposta ao estresse								
2094	IN2-1 protein	SCBGLR1116G12.g	Elaeis guineensis	ACF06541	157	25976/5,41	23/5,17	K.EDVSEETVAALDK.I R.YFDSNFEGPSLLPEDPAKK.Q
2095	Microtubule-associated protein MAP65-1a	SCBGHR1060E05.g	Saccharum hybrid cultivar Q117	AAR00251	193	27635/5,34	7/5,44	K.GSTLQMMGYIPQDGQWSIFGGTGQLTLAR.G + Oxidation (M) K.GSTLQMMGYIPQDGQWSIFGGTGQLTLAR.G + 2 Oxidation (M)
2103	2-cys peroxiredoxin-like protein	SCCST3C07F05.g	Zea mays	ACG35092	146	24848/8,57	19/5,82	R.GLFIIDK.E R.AGGVDDLPLVGNK.A K.EGVIQHSTINNLAIGR.S
Transporte								
2133	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (EC 3.6.3.14)	SCCCLV1003A12.g	Oryza sativa	ABR25443	173	22907/7,98	39/5,02	R.EASIYTGITIAEYFR.D R.TGSVTIVGAVSPPGGDFSDPVTSATLSIVQVFWGLDK.K

Tabela 10 - Proteínas preferencialmente expressas dos internós maduros I9 de 7 meses

(continua)

Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Peptídeos
Metabolismo de aminoácido								
757	Methionine synthase (EC 2.1.1.14)	SCCCRZ2C03A09.g	Sorghum bicolor	AF466201_8	111	24600/4,79	57/6,13	K.AAGASWIQFDEPTLVK.D K.WFDTNYHFIVPELGPSTK.F
Bioenergia								
697	Wali7	SCEZRT2024E04.g	Triticum aestivum	AAC37416	170	30740/8,86	31/4,67	K.GANEVLLVIEAYK.T -.YVEMLVDSVSWIC.- K.DEVFCLFEGVLDNLGR.L
703	Fructokinase (EC 2.7.1.4)	SCCCSD1089E01.g	Zea mays	NP_001105210	396	24024/5,43	35/4,85	R.DFHGAVPSFK.V K.LLLVTLGDLGCK.Y R.TQILSIWDQADIVK.V K.VQQVDTTGAGDAFVGALLR.R
716	NADP-specific isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42)	SCCCLR1C04G09.g	Zea mays	NP_001140324	646	29960/9,03	40/6,92	R.LLDFALK.L K.DLALLVHGSSNVTR.S K.GGETSTNSIASIFAWTR.G R.SHYLNTEEFIDAVATELR.S
730	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor (EC 4.1.1.39)	SCJFLR1073E09.g	Miscanthus sinensis	ABP01444	321	30251/8,88	44/6,81	K.DTDILAAFR.V K.LTYTPEYETK.D K.TFQGPPHGIQVER.D R.GGLDFTKDDENVNSQPFMR.W R.VTPQLGVPPEEAGAAVAESSTGTWTTVWTDGLTSLDR.Y
733	UDP-glucose dehydrogenase (EC 1.1.1.22)	SCQGLB1028A03.g	Gossypium hirsutum	ACJ11739	481	25093/8,58	44/6,16	K.NLFFSTDVEK.H K.AADLTYWESAAR.M K.CPDIEVVVDISKPR.I R.IEAWNSDTLPYEPGLDDVVK.Q

Tabela 10 - Proteínas preferencialmente expressas dos internós maduros I9 de 7 meses

								(continuação)
Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Peptídeos
746	Dihydrolipoamide dehydrogenase precursor (EC 1.8.1.4)	SCQGLB1028A03.g	Gossypium hirsutum	ACJ11739	481	25093/8,58	49/6,99	K.SLPGITIDEK.K K.VVSSTGALCLSEIPK.K K.FSNLEVDLPAMMAQK.D + 2 Oxidation (M) K.LSSPSEVSVDLIDGGSTVVK.G
759	Sucrose synthase 1 (EC 2.4.1.13) (Sucrose-UDP glucosyltransferase 1)	SCQGSD1044A09.g	Sorghum bicolor	ACM69042	205	31546/6,28	58/6,11	K.NMTGLVEMYGK.N K.NMTGLVEMYGK.N + Oxidation (M) K.MYSLIDEYNLK.G + Oxidation (M) K.LGVTQCTIAHALEK.T K.FNIVSPGADMSVYYPYTETDKR.L + Oxidation (M)
760	Sucrose synthase 2 (EC 2.4.1.13) (Sucrose-UDP glucosyltransferase 2)	SCJFRT2055C10.g	Zea mays	NP_001105323	306	23506/5,53	59/6,42	R.SLSALQGALR.K R.VPEYLQFK.E K.SIGNGVQFLNR.H R.VNVSELAVEELR.V K.ESMYPLLNFLR.A R.AQETIHLLDLLEAPDPSTLEK.F
766	Aconitate hydratase, cytoplasmic (EC 4.2.1.3)	SCEQLB2020B11.g	Zea mays	NP_001147431	550	26419/5,17	62/6,14	R.WNELPVPK.E K.YLLEYGVEPK.N R.KPTYLDGMSMSPPSLPK.V + Oxidation (M) K.VTEAYCLNLGDSITTDHISYSGK.I R.DIWPSNQEIDQVVESSVQTHLFK.K
767	Aconitate hydratase, cytoplasmic (EC 4.2.1.3)	SCRFLV1035A01.g	Litchi chinensis	ADZ57218	461	24850/5,73	63/6,36	R.SDDTVAMVESYLR.A R.SDDTVAMVESYLR.A + Oxidation (M) K.SDWLSCLSDVGFK.G K.NGVTATDLVLTVTQMLR.K
769	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme (EC 4.1.2.13)	SCCART1001G08.g	Zea mays	NP_001150049	164	27446/5,51	63/6,41	R.LSSINVENIEENRR.A

Tabela 10 - Proteínas preferencialmente expressas dos internós maduros I9 de 7 meses

								(continuação)
Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp (kDa)	Peptídeos
Dinâmica celular								R.ELLFCAPGALQYLSGVILFEETLYQK.T
729	Tubulin alpha-6 chain	SCMCRT2107H03.g	Miscanthus sinensis	CAD26886	543	22770/5,17	42/5,07	R.GHYTVGK.E R.LSVDYGK.K K.EIVDLCLDR.V R.QLFHPEQLISGK.E R.SLDIERPTYTNLNR.- R.AIFVDLEPTVIDEVR.T K.LADNCTGLQGFLVFNAVGGGTGSGLSLLER.L
752	Lysosomal alpha-mannosidase precursor (EC 3.2.1.24)	SCMCCL6051E03.g	Solanum lycopersicum	ADK66339	322	21843/8,75	52/6,01	K.YAANEQWPLK.T R.LSIGYIQAQELVSTSLACLTESGSK.S R.HSSGLSTDSLGDALALAQHHDVATGTEK.Q
Crescimento e desenvolvimento vegetal								
796	Legumin-like protein	SCJFAD1C10E05.b	Zea mays	ACG36544	1143	22622/7,98	32/5,74	K.DVGLGADLVR.I R.AEGGVLFIVPR.F -.VVVLNTANLPLVK.D K.RLDSEIFFAPPSN.- K.AISAEVLQASFNTTPEMEQLFR.S K.AISAEVLQASFNTTPEMEQLFR.S R.IDAHSMCSPGFSCDSAYQVTYIVR.G K.IADASGMEWFSIITTPNPIFSLAGK.T K.IADASGMEWFSIITTPNPIFSLAGK.T + Oxidation (M)
Metabolismo de proteínas								
691	Cathepsin B	SCCART1002A09.g	Dactylis glomerata	ACY38050	560	27629/5,77	29/5,03	K.HFSIDAYR.I R.INSDPHDIMVEVYK.N R.INSDPHDIMVEVYK.N + Oxidation (M) R.GKNECGIEEDVVAGMPSTK.N R.GKNECGIEEDVVAGMPSTK.N + Oxidation (M) K.NGPVEVAFTVYEDFAHYK.S K.NGPVEVAFTVYEDFAHYK.S K.LIGWGTS DAGEDYWLLANQWNR.G

Tabela 10 - Proteínas preferencialmente expressas dos internós maduros l9 de 7 meses

								(continuação)
Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp (kDa)	Peptídeos
								K.NSNVSTPILIDQGDADK.F
748	T-complex protein 1, gamma subunit (TCP-1-gamma) (CCT-gamma)	SCSGFL4032C03.g	Ricinus communis	XP_002529662	281	25695/8,94	50/6,55	R.TLAQNCGLNVR.I K.WPYEAAALAFEAIPT.T K.ACGAVIVNRPEELQESDVGTGAGLFEVK.K
750	Protein phosphatase 2A	SCRLAM1014G10.g	Arabidopsis thaliana	CAA57529	1234	20471/5,07	51/5,00	R.ADLVPAYVR.L R.LLAVEGCASLGK.L R.SALASVIMGMAPVLGK.D R.SALASVIMGMAPVLGK.D + Oxidation (M) R.SALASVIMGMAPVLGK.D + Oxidation (M) R.SALASVIMGMAPVLGK.D + 2 Oxidation (M) K.DATIEQLLPFLSLK.D R.ILNPQISIQHILPCVK.E K.TEIMSIFDDLTQDDQDSVR.L K.TEIMSIFDDLTQDDQDSVR.L + Oxidation (M) K.LLEPQDCVAHILPVIVNFSQDK.S
762	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4B	SCBGLB2071G09.g	Cucumis melo subsp. melo	ADN33858	276	25987/5,23	60/5,61	K.AIDLIDEAGSR.V K.VITLDMGLLVAGTK.Y + Oxidation (M) K.VPEPTVDETIQLR.G R.GELQCIGATTLDEYR.K
800	26S proteasome regulatory subunit 4 homolog (Tat binding protein homolog 2)	SCSBFL4069H03.g	Arabidopsis thaliana	AF123391_1	1027	23930/4,63	45/6,15	R.TMLELLNQLDGFDSR.G K.APLESYADIGGLDAQIEIK.E K.VLSVVGILQDEVDPMVSVMK.V K.VLSVVGILQDEVDPMVSVMK.V + Oxidation (M) K.VLSVVGILQDEVDPMVSVMK.V + Oxidation (M) R.VADELSPSIVFIDEIDAVGK.R
Metabolismo secundário								
747	Polyphenol oxidase (EC 1.10.3.1)	SCEPAM1052D07.g	Saccharum hybrid	AAB94293	519	22867/8,97	49/6,88	R.ALGDIGDK.T

Tabela 10 - Proteínas preferencialmente expressas dos internós maduros I9 de 7 meses

(conclusão)								
Spot	Proteína	Acesso (SUCEST)	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp (kDa)	Peptídeos
756	Phenylalanine ammonia-lyase (EC 4.3.1.5)	SCCCST3C11A05.g	Saccharum officinarum	ABM63378	537	25452/9,34	54/6,15	K.DAFANPLYDPNR.N R.NTANVNALVDLDYLSHR.D K.TFALPFWSWDAPAGMVVPALFK.D K.TFALPFWSWDAPAGMVVPALFK.D + Oxidation (M) K.TFALPFWSWDAPAGMVVPALFK.D + Oxidation (M)
								R.FEILEAITK.L K.DGPALQVELLR.H R.NNTLLQGYSGIR.F R.TKDGPALQVELLR.H R.HLNAGIFGTGSDGHTLPSEVVR.A K.ASSEWILDICIAHGGDIYGVTTGFGGTSHR.R
Resposta ao estresse								
773	Glutathione S-transferase GST 9 (EC 2.5.1.18)	SCCCAM2C02F10.g	Zea mays	NP_001105625	1426	25481/6,78	26/7,05	R.VLTCLFEK.N K.QVLDVYDEILSK.N R.QDPAVIAENEDKLK.Q K.NEYLAGDEFTLADLSHLPNSHYIVNTER.G R.ASIEQWLQAEAQNFPPSSALVFQLAFVPHLSHLGIR.Q
Transporte								
749	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (EC 3.6.3.14)	SCVPFL4C12F12.g	Zea mays	ACG48688	94	24202/5,80	50/6,13	-.DMGYNVSMMDSTSR.W R.TGSVTIVGAVSPPGGDFSDPVTSATLSIVQVFWGLDK.K

Para as proteínas que geraram apenas um *hit*, 81 no total, 27 são referentes às proteínas diferencialmente expressas entre as plantas de 10 e 7 meses, 31 proteínas preferencialmente expressas para 10 meses e 23 preferencialmente expressas para 7 meses. A Figura 25 mostra a categorização das 81 proteínas identificadas com *hit* e que efetivamente puderam ser atreladas a um processo celular.

Figura 25 - Classificação funcional das 81 proteínas identificadas com um único *hit*. O universo de proteínas identificadas nesta figura representam as proteínas diferencialmente expressas e as proteínas preferencialmente expressas para o internó maduro de 10 e 7 meses. Das 18 categorias descritas por Vettore et al. (2003), 12 foram mostradas

No trabalho de categorização desenvolvido por Vettore et al. (2003), os autores verificaram que as categorias mais representativas, segundo o agrupamento feito entre as bibliotecas de ESTs dos tecidos dos internós 1 e 4, casca do colmo e região de transição entre a parte radicular e parte aérea da variedade SP80-3280 foram: “Metabolismo de proteínas” (18,3%); “Dinâmica celular” (18,1%); “Bioenergia” (15,8%) e “Resposta ao estresse” (14,9%). Nessa vertente, a categorização das proteínas totais identificadas no presente trabalho mostrou que as categorias mais expressivas foram:

“Metabolismo de proteínas” (29,62%); “Dinâmica celular” (11,11%); “Bioenergia” (24,69%) e “Resposta ao estresse” (9,87%). Essas quatro categorias foram as mais frequentes encontradas nos internós maduros de 10 e 7 meses.

Em decorrência do sistema de análise de imagem adotado, podemos separar as proteínas analisadas por géis 2D-PAGE em proteínas diferencialmente expressas e preferencialmente expressas. Uma avaliação mais focada dentro de cada análise permite avaliar mais profundamente a contribuição das proteínas identificadas no processo de acúmulo de sacarose.

Figura 26 - Classificação funcional das 27 proteínas diferencialmente expressas, identificadas com um único *hit*, entre os internós I9 de 10 meses e internó I9 de 7 meses

A categorização agora, foi realizada para as proteínas diferencialmente expressas entre as canas de 10 e 7 meses, Figura 26 acima. Esse tipo de categorização permite identificar quais os grupos de proteínas foram mais frequentemente encontrados na comparação dos internós maduros em ambas as idades. A categoria mais expressa é a

da “Dinâmica celular” e sua subcategoria “Biogênese, organização e estrutura celular”, Figura 26, participa com 4 proteínas identificadas. As proteínas identificadas para essa subcategoria foram: *Translational elongation factor Tu*, *Nucleoside diphosphate kinase I*, *Tubulin beta chain* e *Vacuolar ATP synthase subunit B isoform 1*.

Outra enzima importante caracterizada no processo de acúmulo de sacarose é a *caffeic acid 3-O-methyltransferase* (COMT) (EC 2.1.1.68). Esta enzima participa da categoria de “Resposta ao estresse”. Pela análise realizada no programa de imagem, o internó 9 aos 10 meses aumentou 2,15 vezes a expressão da proteína COMT, quando comparada ao internó 9 aos 7 meses. A importância da biossíntese de lignina e o espessamento da parede secundária parecem ser dominantes em internós maduros em processo de amadurecimento. O parênquima de estocagem dos internós maduros de cana são lignificados e suberizados e esse processo paralelo aumenta o conteúdo de sacarose (WALSH et al., 2005). O processo de lignificação e/ou suberização reduz a perda de água principalmente das células da casca e também restringem o movimento apoplástico dos solutos da bainha do feixe (CASU et al., 2004). Com excessão da cinamato 4-hidroxilase (C4H) que está ancorada na superfície externa da membrana do retículo endoplasmático rugoso a maioria das enzimas da rota da biossíntese da lignina está localizada no citossol; fenilalanina amônia liase (PAL), álcool cinâmico desidrogenase (CAD), cinamoil CoA-redutase e COMT (RUELLAND et al., 2003). A biossíntese da parede celular pode reduzir a acumulação da sacarose desde que o fluxo de carbono seja direcionado para o crescimento da planta, também, a expansão da parede celular pode alterar a partição do carbono proveniente da sacarose. Dentro destas possibilidades, é possível que a acumulação da sacarose dispare sinais os quais resultam no aumento da lignificação das células do parênquima do colmo e que o processo de crescimento celular seja interrompido (PAPINI-TERZI et al., 2009).

Ainda na comparação das proteínas diferencialmente expressas nos internós maduros do colmo da cana, a proteína 14-3-3 está intimamente ligada ao processo de acúmulo de sacarose nas células do parênquima de estocagem (PAPINI-TERZI et al., 2009). A proteína 14-3-3 está inserida na categoria de “Comunicação celular” subcategoria “Transdução de sinais”. Pela análise das imagens dos géis, a expressão da

proteína foi reduzida aos 10 meses quando comparado aos 7 meses. A proteína 14-3-3 juntamente com a SNRK, fosforilam e inibem a ação do anabolismo da SPS (HRABAK et al., 2003; PAPINI-TERZI et al., 2009). A proteína 14-3-3 diminuiu 147 vezes seu nível de expressão aos 10 meses de idades. Assim como discutido no item 5.2.4, a SNRK através da técnica de qPCR, também apresentou redução da expressão nas canas de 10 meses. A avaliação dos resultados encontrados por ambas as técnicas, transcritômica e proteômica, para esse caso, corroborando com a ideia que a SNRK e 14-3-3 diminuem a expressão em internós em amadurecimento e não atuam fosforilando as principais enzimas da via de biossíntese de sacarose, SPS e SUSY.

Na categorização das proteínas preferencialmente expressas do I9 aos 10 meses, a categoria que mais contribui com o número de proteínas identificadas foi a categoria “Metabolismo de proteínas” mais especificamente a subcategoria “Dobramento e estabilização de proteínas”, Figura 27.

Figura 27 - Classificação funcional das 31 proteínas preferencialmente expressas, identificadas com um único *hit*, do internó maduro I9 aos 10 meses

Nesta subcategoria estão presentes as proteínas denominadas de choque térmico - *Heat shock protein* (HSP). As HSPs são diversas e abundantes e possuem membros passíveis de serem encontrados em quase todos os espaços celulares. As HSPs, identificadas como preferencialmente expressas, para as canas de 10 meses foram as de baixo HSP 16.9 e HSP 17.2 e alto peso molecular HSP 70. No citossol, há no mínimo duas classes de HSP de baixo peso, a classe I e classe II. As HSP da classe I são as mais abundantes. Por exemplo, nas células das folhas da soja, as HSPs de baixo peso estão presentes em mais de 1% das proteínas expressas (VIERLING et al., 1991). Especificamente para a cana-de-açúcar, a análise das bibliotecas de ESTs do projeto SUCEST revelou que as HSP são responsáveis por quase 5% dos ESTs avaliados, e dentre estes, a classe de HSP I representa 59% com 5 genes anotados (TIROLI; RAMOS, 2007). Classicamente as HSPs estão ligadas a estresses causados por altas temperaturas desempenhando papel protetor das outras proteínas. Embora as HSPs tenham sido primeiramente caracterizadas em decorrência da sua superexpressão em resposta às altas temperaturas, algumas HSPs foram encontradas em níveis significativos em condições normais, células não estressadas ou mesmo produzidas em estágios particulares do ciclo celular (VIERLING, 1991).

Pelo menos 5 isoformas da proteína *protein disulfide isomerase* (PDI) foram detectadas como preferencialmente expressas para o internó 9 aos 10 meses. As PDI interagem com os peptídeos nascentes para catalisar o dobramento, isomerização e oxidação/redução das pontes dissulfetos (S-S) (WILKINSON; GILBERT, 2004). As proteínas PDI são membros de uma família multigênica que incluem as superfamílias glutaredoxinas, tioredixinas, ferredoxinas e peroxidoxinas. Como função, as proteínas PDI desempenham papel importante em todas as células, especialmente nas células voltadas para secreção e estocagem (HOUSTON et al., 2005).

A avaliação da categorização das proteínas preferencialmente expressas identificadas nas canas de 7 meses, Figura 28, mostra que a categoria que contribui com maior número de proteínas é a categoria de “Bioenergia”, seguida pela categoria de “Metabolismo de proteínas”. Ambas as categorias, juntas, são responsáveis por 73,9% das proteínas caracterizadas como preferencialmente expressas.

Figura 28 - Classificação funcional das 23 proteínas preferencialmente expressas, identificadas com um único *hit*, do internó maduro I9 aos 7 meses

Nesta categoria de “Bioenergia”, a subcategoria “Compostos-C e metabolismo de carboidratos” se destaca, pois das 23 proteínas identificadas 11 pertencem a essa subcategoria. Esse fato possivelmente seja em decorrência do estágio de desenvolvimento das plantas, pleno crescimento vegetativo. Dentre as proteínas identificadas e diretamente relacionadas ao metabolismo de carboidratos, estão a frutoquinase, frutose 1,6-bisfosfato aldolase, sacarose sintase 1, sacarose sintase 2 e UDP-glicose desidrogenase.

Existem evidências que a enzima SUSY está associada à membrana e está envolvida diretamente na biossíntese de celulose (AMOR et al., 1995). Para a cana-de-açúcar isso ainda não está bem estabelecido. Porém este aspecto é importante já que a enzima SUSY quando hidrolisa a sacarose gera UDP-glicose, a qual está diretamente associada com a biossíntese de glucanas (SCHÄFER et al., 2004). A UDP-glicose

desidrogenase catalisa a oxidação da UDP-glicose à ácido UDP-glucurônico com a concomitante redução de duas moléculas de NAD^+ (TURNER; BOTHA 2002). O ácido UDP-glucurônico serve como substrato para as glicosiltransferases e para a interconversão das enzimas dos açúcares nucleotídeos, o quais produzem precursores para as hemiceluloses e pectinas (GIBEAUT; 2000), Figura 29.

Figura 29 - Rota metabólica da biossíntese de celulose, hemicelulose e pectina. As enzimas sacarose sintase (EC 2.4.1.13) e UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22) estão destacadas pela cor cinza. Adaptado de Carvalho et al. (2008)

O crescimento e o desenvolvimento do colmo de cana é um processo contínuo o qual resulta num gradiente de maturação e acumulação de sacarose, do topo em direção à base da planta. A taxa de acumulação aumenta drasticamente entre o internó 4 a 7, atingindo o ápice entre o internó 7 e 8 (WHITTAKER; BOTHA, 1997). Sendo assim, Carson e Botha (2002) identificaram que 10% dos transcritos avaliados dos internós maduros (7) do colmo de cana eram homólogos aos genes associados ao metabolismo de carboidratos, porém nenhum dos genes avaliados eram associados diretamente ao metabolismo da sacarose. No mesmo trabalho, os autores encontraram como sendo um transcrito preferencialmente expresso no internó 7 o EST frutose 1,6-

bisfosfato aldolase (EC 4.1.2.13). Neste mesmo caminho, em nosso trabalho, foi encontrada esta proteína, preferencialmente expressa no internó 9 das plantas de 7 meses. O metabolismo da sacarose no citossol do parênquima de estocagem é um processo que pode influenciar a acumulação da sacarose, particularmente no processo que governa a partição de carbono nestas células (BINDON; BOTHA 2002). Enzimas como pirofosfato: frutose 6-fosfato 1-fosfotransferase (PFP), ATP: frutose 6-fosfato 1-fosfotransferase (PFK) em associação com a frutose bisfosfato aldolase, Figura 30, desempenham papel central no metabolismo de carboidratos no citossol, representando o primeiro passo para o processo de respiração celular e obtenção de energia.

Figura 30 - Interconversão entre frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato. Os retângulos pretos destacam a participação da enzima frutose 1,6-bisfosfato aldolase, enzima reversível, ponto regulatório entre a via da glicólise e gliconeogênese

A proteína fenilalanina amônia liase (PAL), Figura 31, primeira enzima da rota da lignina, foi identificada como preferencialmente expressa no internó 9 aos 7 meses. Como discutido anteriormente, a lignificação do internó em processo de amadurecimento é importante para a estocagem da sacarose. Aos 7 meses, estágio onde as plantas estão terminando o crescimento vegetativo e preparando-se para o

processo de maturação, a rota da lignina é preferencialmente intensificada. Sabe-se muito pouco sobre a via de biossíntese da lignina em cana-de-açúcar, principalmente comparado às grandes culturas (MOURA et al., 2010). A lignina parece variar entre 4 a 9% (VILELA, 2008), isto tem implicação direta, principalmente na biomassa gerada para produção de etanol de segunda geração.

Figura 31 - Rota da biossíntese de monolignóis. PAL-fenilalanina amônia liase; C4H-cinamato 4-hidroxilase; C3H-cumarato 3-hidroxilase; 4CL-4 cumarato CoA ligase; COMT-ácido cafeico O-metiltransferase; F5H-ferulato 5-hidroxilase; CCoA3H-cafeil CoA 3-hidroxilase; CCoAOMT-cafeil CoA 3-O-metiltransferase; CCR-cinamil CoA redutase; CAD-álcool cinâmico desidrogenase; SAD-álcool sinápico desidrogenase (RUELLAND et al., 2003)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sacarose pode ser formada nas células de estocagem pela junção de uma molécula de glicose e uma de frutose. Dessa forma, em teoria, a concentração da sacarose nas células do parênquima de estocagem pode ser aumentada pela intensificação do processo de síntese ou então pela diminuição da atividade catabólica da sacarose.

Os modelos propostos para estudar a expressão dos principais genes relacionados à biossíntese de sacarose foram bastante interessantes. Em um deles podemos observar o efeito do desenvolvimento da planta na expressão dos genes estudados. Para cada idade, a expressão dos transcritos foram avaliadas através da técnica de qPCR. Essa visão global entre as idades, serviu como suporte para avaliar fisiologicamente o comportamento da expressão dos transcritos de cada enzima com diferentes concentrações de açúcares do caldo da cana. Em uma segunda etapa podemos observar o efeito do acúmulo de sacarose nos genes relacionados direta e indiretamente no metabolismo da sacarose, bem como o efeito no proteoma dos internós maduros com diferentes concentrações de sacarose, aos 7 e 10 meses de idade.

Com relação aos açúcares solúveis do caldo, a metodologia para favorecer o armazenamento da sacarose no colmo da cana foi utilizada apenas para as plantas de 10 meses. Sob condição de restrição hídrica os açúcares do caldo, principalmente a sacarose, aumentaram sensivelmente comparado às outras idades. Em particular, o efeito do acúmulo de sacarose foi verificado entre os internós maduros (9) das plantas de 7 e 10 meses. A diferença da média das alturas entre estas duas idades não foi significativa, tornando o modelo de estudo restrito ao efeito da acumulação da sacarose nos internós já maduros.

A avaliação da expressão dos transcritos comparando os internós maduros das canas de 7 e 10 meses de idade mostrou que o acúmulo da sacarose é um processo que depende da integração de várias enzimas. Enzimas relacionadas à hidrólise da sacarose, como a sacarose sintase e invertases, são importantes nos internós em

amadurecimento para manterem o processo de descarregamento do floema direcionado às células do parênquima de estocagem. A geração dos monossacarídeos, glicose e frutose, também é importante para manter o metabolismo basal das células de armazenamento.

Por outro lado, as enzimas de síntese de sacarose, como a sacarose fosfato sintase e sacarose fosfato fosfatase, intensificaram a expressão do seus transcritos. O mecanismo de acúmulo de sacarose em colmo de cana parece não depender exclusivamente da diminuição da atividade hidrolítica da sacarose, mas sim da intensificação das enzimas que sintetizam a sacarose.

Os genes diretamente envolvidos no metabolismo de carboidrato não são abundantes nos colmos da cana. Por isso, o acúmulo de sacarose não depende somente das enzimas da rota da biossíntese da sacarose. Outros mecanismos são relacionados ao processo de acúmulo de açúcar no colmo. A proteômica auxilia nesse sentido. Através dessa técnica é possível identificar as proteínas diferencialmente expressas, bem com as preferencialmente expressas para cada idade. Alguns mecanismos, como quinase e fosfatase, exercem controle sobre a via de biossíntese da sacarose. Um exemplo disso é a quinase protéica SNRK e proteína 14-3-3, ambas fosforilam a SPS e SUSY afetando diretamente o balanço de açúcar no colmo da cana. Para as plantas de 10 meses de idade, a proteína 14-3-3 teve redução de 147 vezes no valor da sua expressão comparada as plantas de 7 meses.

Outro grupo importante de proteínas são as *Heat shock proteins* (HSP). Tanto as HSPs de baixo, como as de alto peso molecular foram identificadas como preferencialmente expressas nas plantas de 10 meses de idade. O papel destas proteínas é basicamente proteger outras proteínas contra estresses ambientais. Particularmente em cana-de-açúcar, as HSPs contribuem com cerca de 5% dos ESTs anotados no programa SUCEST-FUN.

Portanto, mesmo que se conheça bastante sobre o cultivo da cana-de-açúcar ainda são muito pouco conhecidos os processos genéticos e bioquímicos do acúmulo de sacarose. O estudo conjunto do transcrito e proteoma do colmo da cana poderá

trazer informações relevantes para possíveis marcas genéticas. O incremento na quantidade de sacarose acumulada no colmo da cana é o objetivo de muitos grupos de pesquisas espalhados pelo mundo.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, H.; ZHU, Y.J.; CARR, J.; MOORE, P.H. Structural and expression of soluble acid invertases genes in the stem of high and low sucrose accumulating *Saccharum* species and hybrids. In: WILSON, J.R.; HOGARTH, D.M.; CAMPBELL, J.A.; GARSIDE, A.L. (Ed.). **Sugarcane: research towards efficient and sustainable production**. Parkville: Division of Tropical Crops and Pastures, 1996. p. 102-104.
- ALBERTSON, P.L.; PETERS, K.F.; GROF, C.P.L. An improved method for the measurement of cell wall invertase activity in sugarcane tissue. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 28, p. 323-328, 2001.
- AMALRAJ, R.S.; SELVARAJ, N.; VELUSWAMY, G.K.; RAMANUJAN, R.P.; MUTHURAJAN, R.; PALANIYANDI, M.; AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R.; VISWANATHAN, R. Sugarcane proteomics: establishment of a protein extraction method for 2-DE in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map. **Electrophoresis**, Kyoto, v. 31, p. 1959-1974, 2010.
- AMOR, Y.; HAIGLER, C.H.; JOHNSON, S.; WAINSCOTT, M.; DELMER, D.P. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 9353-9357, 1995.
- 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**, Chicago, v. 64, p. 5245-5250, 2004.
- AVIGAD, G. Sucrose and other disaccharides. In: LOEWUS, T.A.; TANNER, W. **Encyclopedia of plant physiology**. Heidelberg: Springer, 1982. p. 217-347.
- AVONCE, N.; LEYMAN, B.; ITURRIAGA, G. Trehalose metabolism and glucose sensing in plants. **Biochemistry**, London, v. 33, p. 276-279, 2005.
- BAGINSKY, S. Plant proteomics: concepts, applications and novel strategies for data interpretation. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 28, p. 93-120, 2008.
- BAYMA, C. **Tecnologia do açúcar: da matéria prima à evaporação**. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Alcool, 1974. 292 p.
- BENDA, G.T.A. Numbering sugarcane leaves and shoots. **Sugarcane Pathology Newsletter**, Baton Rouge n. 3, p. 16-18, 1969.
- BERNARDES, M.S.; CÂMARA, G.M.S. **Cultura da cana-de-açúcar**. Piracicaba: ESALQ, Depto. de Produção Vegetal, 2001. 20 p.

BERTIN, P.; GALLAIS, A. Genetic variation for nitrogen use efficiency in a set of recombinant inbred lines. II. QTL detection and coincidence. **Maydica**, Bergamo, v. 46, p. 53-68, 2001.

BINDON, K.A.; BOTHA, F.C. Carbon allocation to the insoluble fraction, respiration and triose-phosphate cycling in the sugarcane culm. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 116, p. 12-19, 2002.

BOSCH, S.; GROF, C.P.L.; BOTHA, F.C. Expression of neutral invertases in sugarcane. **Plant Science**, Waterbury, v. 5, p. 1125-1133, 2004.

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**, Collingwood, v. 27, p. 81-85, 2000.

BOUDSOCQ, M.; LAURIERE, C. Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 138, p. 1185-1194, 2005.

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

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 7, p. 248-254, 1976.

BUCZYNSKI, S.R.; THOM, M.; CHOUREY, P.; MARETZKI, A. Tissue distribution and characterization of sucrose synthase isoenzymes in sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 142, p. 641-646, 1993.

BUSTIM, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 25, p. 169-193, 2000.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, New York, v. 25, n. 9, p.1327-1333, May 2004.

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

CASTLADEN, C.K.; AOKI, N.; GILLESPIE, V.J.; MACRAE, E.A.; QUICK, W.P.; BUCHNER, P.; FOYER, C.H.; FURBANK, R.T.; LUNN, J.E. Evolution and function of the sucrose phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 135, p. 1753-1764, 2004.

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

CASU, R.E.; DIMMOCK, C.M.; CHAPMAN, S.C.; GROF, C.P.L.; MCINTYRE, C.L.; BONNET, 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**, Berlin, v. 54, p. 503-517, 2004.

CARVALHO, M.C.C.G.; CALDAS, D.G.; CARNEIRO, R.T.; MOON, D.H.; SALVATIERRA, G.R.; FRANCESCHINI, L.M.; ANDRADE, A. de; CELEDON, P.A.; ODA, S.; LABATE, C.A. SAGE transcript profiling of the juvenile cambial region of *Eucalyptus grandis*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 6, p. 905-919, 2008.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H.M.C.; ARRUDA, P.; FILHO, J.C.B.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; CIERO, L.; FERRO, J.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; FILGUEIRAS, T.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO, E.C.; HOFFMANN, H.P.; LANDELL, M.G.A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F.C.; ROMANO, E.; SILVA, W.J.; FILHO, M.C.S.; ULIAN, E.C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 1, p. 62-89, 2011.

CHOUREY, P.S. Genetic control of sucrose synthase in maize endosperm. **Molecular & General Genetic**, Berlin, v. 184, p. 372-376, 1981.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_09_14_50_boletim_cana_3o_lev_safra_2010_2011..pdf>. Acesso em: 28 jan. 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_27_11_53_13_boletim_cana_portugues_-_maio_2011_1o_lev..pdf>. Acesso em: 22 jun. 2011b.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 7-84.

DAI, N.; COHEN, S.; PORTNOY, V.; TZURI, G.; HAREL-BEJA, R.; POMPAN-LOTAN, M.; CARMÍ, N.; ZHANG, G.; DIBER, A.; POLLOCK, S.; KARCHI, H.; YESELSON, Y.; PETREIKOV, M.; SHEN, S.; SAHAR, U.; HOVAV, R.; LEWINSOHN, E.; TADMOR, Y.; GRANOT, D.; OPHIR, R.; SHERMAN, A.; FEI, Z.; GIOVANNONI, J.; BURGER, Y.; KATZIR, N.; SCHAFFER, A.A. Metabolismo of soluble sugar in developing melon fruit: a global transcriptional view of metabolic transition to sucrose accumulation. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 76, p. 1-18, 2011.

DEJARDIN, A.; SOKOLOV, L.N.; KLECZKOWSKI, L.A. Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-response sucrose synthase gene in *Arabidopsis*. **Biochemical Journal**, London, v. 344, p. 503-509, 1999.

DELGADO, A.A.; CÉSAR, M.A.A. **Elementos da tecnologia e engenharia do açúcar de cana**. Piracicaba:ESALQ, Depto. de Tecnologia Rural, 1977. 364 p.

DIZ, A.P.; TRUEBANO, M.; SKIBINSKI, D.O.F. The consequences of sampling pooling in proteomics: an empirical study. **Electrophoresis**, New York, v. 30, p. 2967-2975, 2009.

DU, Y.C.; NOSE, A.; KONDO, A.; WASANO, K. Diurnal change in photosynthesis in sugarcane leaves. Enzyme activities and metabolite levels relating of sucrose and starch metabolism. **Plant Production Science**, Kyoto, v. 3, p. 9-16, 2000.

EBRAHIM, M.K.H. ZINGSHEIM, O. EL-SHOUBAGY, M.N.; MOORE, P.H.; KOMOR, E. Growth and sugar storage in sugarcane grown at temperatures below and above optimum. **Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 153, p. 593-602, 1999.

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

EHNESS, R.; ECKER, M.; GODT, D.E.; ROITSCH, T. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanism via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. **The Plant Cell**, Oxford, v. 9, p. 1825-1841, 1997.

FOTOPOULOS, V. Plant invertases: struture, function and regulation of a diverse enzyme family. **Journal of Biological Research**, Thessaloniki, v. 4, p. 127-137, 2005.

FUKUDA, M.; ISLAM, N.; W. SH.; YAMAGISHIY, A.; TAKAOKA, M.; HIRANO, H. Assessing matrix assisted laser desorption/ ionization-time of flight-mass spectrometry as a means of rapid embryo protein identification in rice. **Electrophoresis**, New York, v. 24, p. 1319-1329, 2003.

GILBEAUT, D.M. Nucleotide sugar and glucosyltransferase for synthesis of cell wall matrix polyssacharides. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, p. 69-80, 2000.

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

GLASZIOU, K.T.; GAYLER, K.R. Storage of sugars in stalks of sugar cane. **The Botanical Review**, Lancaster, v. 4, p. 471-488, 1972.

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

GODDIJN, O.J.M.; VAN DUN, K. Trehalose metabolism in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 8, p. 315-319, 1999.

GROENEWALD, J-H.; BOTHA, F.C. Molecular and kinetic characterisation of sugarcane: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and its possible role in sucrose accumulation phenotype. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 34, p. 517-525, 2007.

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

GROF, C.P.L.; SO, C.T.E.; PERROUX, J.M.; BONNETT, G.D.; FORRESTER, R.I. The five families of sucrose phosphate synthase genes in *Saccharum* spp are differentially expressed in leaves and stem. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 33, p. 605-610, 2006.

GROF, C.P.L.; ALBERTSON, P.L.; BURSLE, J.; PERROUX, J.M.; BONNETT, G.D.; MANNERS, J.M. Sucrose-phosphate synthase, a biochemical marker of high sucrose accumulation in sugarcane. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 1530-1539, 2007.

GUTIÉRREZ-MICELI, F.A.; MORALES-TORRES, R.; JESÚS ESPINOSA-CASTAÑEDA, Y. de; RINCÓN-ROSALES, R.; MENTES-MOLINA, J.; OLIVA-LLAVEN, M.A.; DENDOOVEN, L. Effects of partial defoliation on sucrose accumulation, enzyme activity and agronomic parameters in sugarcane (*Saccharum* spp.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 190, p. 256-261, 2004.

HAGGI, E.; FLEMING, A.J. Sucrose synthase expression patterns in young maize leaves. **Planta**, Berlin, v. 21, p. 326-329, 2001.

HALFORD, N.G.; PAUL, M.J. Carbon metabolite sensing and signalling. **Plant Biotechnology Journal**, Malden, v. 1, p. 381-493, 2003.

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.

HAWKER, J.S.; JENNER, C.R.; NIEMIETZ, C.M. Sugar metabolism and compartmentation. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 18, p. 227-237, 1991.

HESSE, H.; SONNEWALD, U.; WILLMITZER, L. Cloning and expression analysis of sucrose-phosphate synthase from sugar beet (*Beta vulgaris*). **Molecular General Genetics**, Berlin, v. 247, p. 515-520, 1995.

HOEPFNER, S.W.; BOTHA, F.C. Expression of frutokinase isoformas in the sugarcane culm. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 741-747, 2003.

_____. Purification and characterization from the culm of sugarcane. **Plant Science**, Waterbury, v. 167, p. 645-654, 2004.

HOUSTON, N.L.; FAN, C.; XIANG, Q.Y.; SCHULZE, J.M.; JUNG, R.; BOSTON, R.S. Phylogenetic analysis identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family in plants, including single –domain protein disulfide isomerase-related proteins. **Plant Physiology**, Collingwood, v. 137, p. 762-778, 2005.

HRABAK, E.M.; CHAN, C.W.M.; GRIBSKOV, M.; HARPER, J.F.; CHOI, J.H.; HALFORD, N.; KUDLA, J.; LUAN, S.; NIMMO, H.G.; SUSSMAN, M.R.; WALKER-SOMMONS, M.T.K.; ZHU, J.K.; HARMON, A.C. The Arabidopsis SDPK-SnRK superfamily of protein kinase. **Plant Physiology**, Collingwood, v. 132, p. 666-680, 2003.

HU, H.; DAI, M.; YAO, J.; XIAO, B.; LI, X.; ZHANG, Q.; XIONG, L. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 29, p. 12987-12992, 2006.

HUBBARD, N.L.; HUBER, S.C.; PHARR, D.M. Sucrose phosphate synthase and acid invertases as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo*) fruits. **Plant Physiology**, Collingwood, v. 91, p. 1527-1534, 1989.

HUBER, S.C.; AKAZAWA, T. A novel sucrose synthase pathway for sucrose degradation in cultured sycamore cells. **Plant Physiology**, Collingwood, v. 81, p. 1008-1013, 1986.

HUBER, S.C.; HUBER, J.L. Role and regulation of sucrose phosphate synthase in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology of Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 431-444, 1996.

HURKMAN, W.J.; TANAKA, C.K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 81, p. 802-806, 1986.

ISHIMARU, K.; ONO, K.; KASHIWAGI, T. Identification of a new gene controlling plant height in rice using candidate-gene approach. **Planta**, Berlin, v. 218, p. 388-395, 2003.

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**, Palo Alto, v. 22, p. 325-337, 2004.

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

JACOBSEN, K.R.; FISHER, D.G.; MARETZI, A.; MOORE, P.H. Developmental changes in anatomy of the sugarcane stem in relation to phloem unloading and sucrose storage. **Botanica Acta**, Stuttgart, v. 105, p. 70-80, 1992.

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

JANGPROMMA, N.; KITTHAISONG, S.; LOMTHAISONG, K.; DADUANG, S.; JAISIL, P.; THAMMASIRIRAK, S. A proteomics analysis of drought stress-responsive proteins as biomarker for drought-tolerant sugarcane cultivars. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 6, p. 89-102, 2010.

JORRÍN, J.V.; MALDONADO, A.M.; CASTILLEJO, M.A.A. Plant proteome analysis: a 2006 update. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, n. 16, p. 2947-2962, 2007.

JORRÍN-NOVO, J.V.; MALDONADO, A.M.; ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S.; VALLEDOR, L.; CASTILLEJO, M.A.; CURTO, M.; VALERO, J.; SGHAIER, B.; DONOSO, G.; REDONDO, I. Plant proteomics update (2007-2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 72, p. 285-314, 2009.

KARP, N.A.; SPENCER, M.; LINDSAY, H.; O'DELL, K.; LILLEY, K.S. Impact of replicate types on proteomics expression analysis. **Journal of Proteome**, New York, v. 4, p. 1867-1871, 2005.

KLANN, E.M.; CHETELAT, R.T.; BENNETT, A.B. Expression of acid invertases gene controls sugar composition in tomato (*Lycopersicon*) fruit. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 103, p. 863-870, 1993.

KLANN, E.M.; HALL, B.; BENNETT, B. Antisense acid invertases (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 112, p. 1321-1330, 1996.

KOCK, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanism and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 235-246, 2004.

KOCH, K.E.; YING, Z.; WU, Y.; AVIGNE, W.T. Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for gene sucrose and ethanol metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 417-427, 2000.

KOCH, K.; WU, Y.; XU, J. Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism: potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning and sugar sensing. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, p. 1179-1185, 1996.

KOMOR, E. The physiology of sucrose storage in sugarcane. In: GUPTA, A.K.; KAUR, N. (Ed.). **Carbohydrate reserves in plants: synthesis and regulation**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2000. p. 35-53.

KUNZE, R.; FROMMER, W.B.; FLÜGGE, U-I. Metabolic engineering of plants: the role of membrane transport. **Metabolic Engineering**, Berlin, v. 4, p. 57-66, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LALONDE, S.; WIPF, D.; FROMMER, W. Transporte mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 341-372, 2004.

LALONDE, S.; TEGEDER, M.; THRONE-HOLST, M.; FROMMER, W.B.; PATRICK, J.W. Phloem loading and unloading of sugar and aminoacids. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 26, p. 37-56, 2003.

LEE, J.; COOPER, B. Alternative workflows for plant proteomic analysis. **Molecular BioSystems**, Cambridge, v. 2, p. 621-626, 2006.

LEE, J.; JIANG, W.; QIAO, Y.; CHO, Y.; WOO, M.O.; CHIN, J.W.; KWON, S.W.; HONG, S.S.; CHOI, I-Y.; KOH, H-J. Shotgun proteomic analysis for detecting differentially expressed proteins in the reduced culm number rice. **Proteomics**, Weinheim, v. 11, p. 455-468, 2011.

LEE, H.; STRUM, A. Purification and characterization of neutral and alkaline invertases from carrot. **Plant Physiology**, Collingwood, v. 112, p. 1513-1522, 1996.

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

MA, H.M.; SCHULZE, S.; LEE, S.; YANG, M.; MIRKOV, E.; IRVINE, J.; MOORE, P.; PATERSON, A. An EST survey of the sugarcane transcriptome. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 851-863, 2004.

MAGALHÃES, A.C.N. Ecofisiologia da cana-de-açúcar: aspectos do metabolismo do carbono na planta. In: CASTRO, P.R.C.; FERREIRA, S.O.; YAMADA, T. (Ed.). **Ecofisiologia da produção**. Piracicaba: POTAFOS, 1987. p. 113-118.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; CALHEIROS, G.C. Hibridação em cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. (Ed). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2005. p. 221-254.

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

McCORMICK, S.; MAUVAIS, J.; FEDOROFF, N. Evidence that two sucrose synthase gene in maize are related. **Molecular General Genetics**, Berlin, v. 187, n. 3, p. 494-500, 1982.

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

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

MOORE, P.H.; COSGROVE, D.J. Developmental changes in cell and tissue water relation parameters in storage parenchyma of sugarcane. **Plant Physiology**, Collingwood, v. 96, p. 794-801, 1991.

MOORE, P.H.; BOTHA, F.C.; FURBANK, R.T.; GROF, C.P.L. Potential for overcoming physio-biochemical limits to sucrose accumulation. In: KEATING, B.A.; WILSON, J.R. (Ed.). **Intensive sugarcane production: meeting the challenges beyond 2000**. Wallingford: CAB International, 1997. v. 22, p. 141-155.

MOURA, J.C.M.; BONINE, C.A.V.; VIANA, J.O.F.; DORNELAS, M.C.; MAZZAFERA, P. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. **Journal of Integrative Biology**, Larchmont, v. 52, p. 360-376, 2010.

MUCHOW, R.C.; SPILLMAN, M.F.; WOOD, A.W.; THOMAS, M.R. Radiation interception and biomass accumulation in sugarcane crop grown under irrigated tropical conditions. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 45, p. 37-49, 1994.

MULLER, J.; WIEMKEN, A.; AESCHBACHER, R. Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. **Plant Science**, Kidlington, v. 147, p. 37-47, 1999.

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

O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

OHYAMA, A.; ITO, H.; SATO, T.; NISHIMURA, S.; IMAI, T. Superexpression of acid invertase activity by antisense RNA modifies the sugar composition of tomato fruit. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 36, p. 369-376, 1995.

PAN, Y-Q.; LUO, H-L.; LI, Y-R. Soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase: key enzymes in regulation sucrose accumulation in sugarcane stalk. **Sugar Tech**, New Delhi, v. 11, p. 28-33, 2009.

PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA, F.R.; VÊNCIO, R.Z.N.; FELIX, J.M.; BRANCO, D.S.; WACLAWOVSKY, A.J.; DEL BEM, L.E.V.; LEMBKE, C.G.; COSTA, M.D.L.; NISHIYAMA JR, M.Y.; VICENTINI, R.; VINCENTZ, M.G.A.; ULIAN, E.C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Sugarcane genes associated with sucrose content. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 1-21, 2009.

PATRICK, J.W. Sieve element unloading: cellular pathway, mechanism and control. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 37, p. 223-228, 1990.

PEGO, J.V.; SMEEKENS, S.C.M. Plant frutokinase: a sweet family get-together. **Trends Plant Science**, Kidlington, v. 5, p. 531-539, 2000.

PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J. Proteomics: from protein sequence to function. In: Twyman, R.M. **Principles of proteomics**. New York: Springer-Verlag; BIOS Scientific, 2001. v. 1, chap. 1, p. 1-21.

PERKINS, D.N.; PAPPIN, D.J.C.; CREASY, D.M.; COTTRELL, J.S. Probability-based identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, New York, v. 20, p. 3551-3567, 1999.

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 compartmentation. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, p. 159-168, 2005.

RAE, A.L.; JACKSON, M.A.; NGUYEN, C.H.; BONNETT, G.D. Functional specialization of vacuoles in sugarcane leaf and stem. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 1, p. 13-22, 2009.

RAE, A.L.; CASU, R.E.; PERROUX, J.M.; JACKSON, M.A.; GROF, C.P.L. A soluble acid invertases is directed to the vacuole by signal anchor mechanism. **Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 168, p. 983-989, 2011.

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

REES, T. The organization of glycolysis and the pentose phosphate pathway in plants. In: DOUCE, D. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology**. Baldwin: Springer-Verlag, 1985. p. 391-417.

ROBERTSON, M.J.; MUCHOW, R.C.; WOOD, A.W.; CAMPBELL, J.A. Accumulation of reducing sugar by sugarcane: effects of crop age, nitrogen supply and cultivar. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 49, p. 39-50, 1996.

ROCHA, F.R.; PAPINI-TERZI, F.S.; NISHIYAMA, M.Y.; VENCIO, R.Z. VICENTINI, R.; DUARTE, R.D.; ROSA, V.E.; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A.H. Signal transduction-related responses to phytohormones and environment challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, London, v. 8, p. 71, 2007.

ROITSCH, T.; GONZALEZ, M.C. Function and regulation of plant invertase: sweet sensations. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, p. 606-613, 2004.

RONTEIN, D.; DIEUAIDE-NOUBHANI, M.; DUFOURC, E.J.; RAYMOND, P.; ROLIN, D. The metabolic architecture of plant cells. Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 46, p. 43946-43660, 2002.

ROSE, S.; BOTHA, F.C. Distribution patterns of neutral invertases and sugar content in sugarcane intermodal tissues. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, p. 819-824, 2000.

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

RUELLAND, E.; CAMPALANS, A.; SELMAN-HOUSEIN, G.; PUIGDOMÈNECH, P.; RIGAU, J. Cellular and subcellular localization of the lignin biosynthetic enzymes caffeic acid-O-methyltransferase, cinnamyl alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-coenzyme A reductase in two monocots, sugarcane and maize. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 117, p. 93-99, 2003.

SACHDEVA, M.; BHATIA, S.; BATTI, S.K. Sucrose accumulation in sugarcane: a potential target crop improvement. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 33, n. 5, p. 1571-1583, 2011.

SACHER, J.A.; GLASZIOU, K.T. Sugar accumulation cycle in sugarcane. I. Studies on enzyme of the cycle. **Plant Physiology**, Collingwood, v. 38, p. 338-343, 1963.

SAMBROOK, J. Preparation of reagents and buffers used in molecular cloning. In: FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. 3-84.

SANDERS, D.; PELLOUX, J.; BROWNLEE, C.; HARPER, J.F. Calcium at the crossroad of signaling. **The Plant Cell**, Oxford, v. 14, p. 401-417, 2002.

SCHÄFER, W.E.; ROHWER, J.M.; BOTHA, F.C. Protein level expression and localization of sucrose synthase in sugarcane culm. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 121, p. 187-195, 2003

_____. Protein-level expression and localization of sucrose synthase in the sugarcane culm. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 121, p. 187-195, 2004.

_____. Partial purification and characterization of sucrose synthase in sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 162, p. 11-20, 2005.

SEBKOVÁ, V.; UNGER, C.; HARDEGGER, M.; STRUM, A. Biochemical, physiological and molecular characterization of sucrose synthase from *Daucus carota*. **Plant Physiology**, Collingwood, v. 108, p. 75-83, 1995.

SENEWEERA, S.P.; BARRA, A.S.; BARLOW, E.W.; CONROY, J.P. Diurnal regulation of leaf blade elongation in rice by CO₂. **Plant Physiology**, Collingwood, v. 108, p. 1471-1477, 1995.

SHEN, S.; MATSUBAE, M.; TAKAO, T.; TANAKA, N.; KOMATSU, S. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 132, p. 613-620, 2002.

STRUM, A.; CHRISPEELS, M.J. cDNA cloning of a carrot extracellular b-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. **Plant Cell**, Tokyo, v. 2, p. 1107-1119, 1990.

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

SUNG, S.J.; XU, D.P.; BLACK, C.C. Identification of activity filling sucrose sink. **Plant Physiology**, Collingwood, v. 89, p. 1117-1121, 1989.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: _____. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: ArtMed, 2004. cap. 13, p. 309-334.

TIROLI, A.O.; RAMOS, C.H.I. Biochemical and biophysical characterization of small heat shock protein from sugarcane: involvement of a specific region located at the N-terminus with substrate specificity. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 39, p. 818-831, 2007.

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

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em:
<<http://www.unica.com.br/search.asp>>. Acesso em: 28 out. 2010.

UYS, L.; BOTHAS, F.C.; HOFMEYER, J.H.S.; ROHWER, J.M. Kinetic model of sucrose accumulation in maturing sugarcane culm tissue. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, p. 2375-2392, 2007.

VAN DEN ENDE, W.; VAN LAERE, A. Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. **Plant Physiology**, Collingwood, v. 93, p. 241-246, 1995.

VATTUONE, M.A.; PRADO, F.E.; SAMPIETRO, A.R. Cell wall invertases from sugarcane. **Phytochemistry**, Oxford, v. 20, p. 189-191, 1981,

VETTORE, A.L.; SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics Molecular Biology**, São Paulo, n. 24, p. 1-7, 2001.

VETTORE, A.L.; SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; SOUZA, G.M.; SILVA, A.M.; FERRO, M.I.T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E.A.; LEMOS, M.V.F.; COUTINHO, L.L.; NOBREGA, M.P.; CARRER, H.; FRANÇA, S.C.; BACCI JR, M.; GOLDMAN, M.H.S.; GOMES, S.L.; NUNES, L.R.; CAMARGO, L.E.A.; SIQUEIRA, W.J.; SLUYS, M.A.V.; THIEMANN, O.H.; KURAMAE, E.E.; SANTELLI, R.V.; MARINO, C.L.; TARGON, M.L.P.N.; FERRO, J.A.; SILVEIRA, H.C.S.; MARINI, D.C.; LEMOS, E.G.M.; MONTEIRO-VOTORELLO, C.B.; TAMBOR, J.H.M.; CARRARO, D.M.; ROBERTO, P.G.; MARTINS, V.G.; GOLDMAN, G.H.; OLIVEIRA, R.C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C.A.; ROSSI, M.; ARAUJO, P.G.; SCULACCIO, S.A.; ANGELLA, A.; LIMA, M.M.A.; ROSA JR, V.E.; SIVIERO, F.; COSCRATO, V.E.; MACHADO, M.A.; GRIVET, L.; DI MAURO, S.M.Z.; NOBREGA, F.G.; MENCK, C.F.M.; BRAGA, M.D.V.; TELLES, G.P.; CARA, F.A.A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. Analysis and functional annotation of expressed sequence tag collection of tropical crop sugarcane. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, n. 13, p. 2725-2735, 2003.

VERMA, A.K.; UPADHYAY, S.K.; VERMA, P.C.; SOLOMON, S.; SINGH, S.B. Functional analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS) in sugarcane (*Saccharum*) cultivars. **Plant Biology**, New York, v. 13, p. 325-332, 2011

VIERLING, E. The role of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 579-620, 1991.

VILELA, H. **Cana forrageira**. Disponível em:
<http://www.agronomia.com.br/conteudo/artigos/artigos_cana_forrageira.htm>. Acesso em: 20 jul. 2011.

VORSTER, D.J.; BOTHAS, F.C. Partial purification and characterization of sugarcane neutral invertase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, p. 651-655, 1998.

WACLOWOVSKY, A.J.; SATO, P.M.; LEMBKE, C.G.; MOORE, P.H.; SOUZA, G.M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, p. 263-276, 2010.

WALSH, K.B.; SKY, R.C.; BROW, S.M. The anatomy of the pathway of sucrose unloading within the sugarcane stalk. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, p. 367-374, 2005.

WANG, A.Y.; YU, W.P.; JUANG, R.H.; HUANG, J.W.; SUNG, H.Y.; SU, J.C. Presence of three rice sucrose synthase genes as revealed by cloning and sequencing. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 18, p. 1191-1194, 1992.

WANG, A.Y.; KAO, M.H.; YANG, W.H.; SAYION, Y.; LIU, L.F.; LEE, P.D.; SU, J.C. Differentially and developmentally regulated expression of three rice sucrose synthase gene. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 40, p. 800-807, 1999.

WELBAUM, G.E.; MEINZER, F.C. Compartmentation of solutes and water in developing sugarcane stalk tissue. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 93, p. 1147-1153, 1990.

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

WILKINSON, B.; GILBERT, H.F. Protein disulfide isomerase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1699, p. 35-44, 2004.

WIND, J.; SMEEKENS, S.; HANSON, J. Sucrose: metabolite and signaling molecule. **Phytochemistry**, Oxford, v. 71, p. 1610-1614, 2010.

WINTER, H.; HUBER, S.C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 35, p. 253-289, 2000.

WU, L.; BIRCH, R.G. Double sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, p. 109-117, 2007.

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

ZINK, F.; GONÇALVES, R.; PASSOS, S.M. **Cultura da cana-de-açúcar**. São Paulo: Secretaria de Agricultura, 1978. 15 p. (Boletim Técnico, 121).

ZHU, Y.J.; KOMOR, E.; MOORE, P.H. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertases and sucrose phosphate synthase. **Plant Physiology**, Collingwood, v. 115, p. 609-616, 1997.

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

ANEXOS

ANEXO A - Tampão de extração

Tris HCl pH 7,5	0,5M
Sacarose	0,7M
KCl	0,1M
EDTA	50mM
PMSF	2mM
B-mercaptoetanol	2%

ANEXO B - Tampão de solubilização

Uréia	7M
Triton-X 100	0,4%
DTT	50 mM
TCEP	2 mM
CHAPS	4%

ANEXO C - Tampão de Desnaturação

Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
Glycerol	10%
SDS	10%
β -mercaptoetanol	5%
Bromofenol blue	1%

ANEXO D - Tampões Laemmli

Tris	25 mM
Glicina	192mM
SDS	0,1% (apenas para superior)
(Preparado em água Milli-Q)	

ANEXO E - Solução fixadora

Etanol	40%
Ácido acético	10%
Em água Milli-Q	

ANEXO F - Solução de coloraçãoa) Solução Estoque *Dye*

Comassie G250	0,1%
Ácido fosfórico	2%
Sulfato de Amônio	10%
Em água Milli-Q	

ANEXO G - Solução de equilíbrio

Tris-HCl pH 6,8	50 mM
Uréia	6 mM
Glicerol	30%
SDS	2%

ANEXO H - Solução de descoloração

ACN	50%
Bicarbonato de Amônio	25 Mm

ANEXO I - Solução bloqueadora

ACN	50%
Ácido Fórmico	5%
Água Milli-Q	45%

ANEXO J - Solução de eluição 1

Metanol	60%
Ácido Fórmico	1%
Água Milli-Q	39%

ANEXO K - Solução de eluição 2

ACN	50%
Ácido Fórmico	1%
Água Milli-Q	49%

ANEXO L

Tabela 11 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

(continua)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
17	Ascorbate peroxidase (1.11.1.11)	SCJFFL1C05E10.g	Resposta ao estresse	Zea mays	NP_001150192	158	22874/8,26	12/6,58	3
	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor	SCCCRZ1003A03.g	Metabolismo de proteínas	Zea mays	NP_001151739	151	19338/4,91		3
19	Vacuolar ATP synthase subunit B	SCCCLB2005G12.g	Dinamica celular	Zea mays	NP_001152665	597	30749/5,11	43/5,21	8
	Enolase 1 (EC 4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase 1)	SCCCRT1001E02.g	Metabolismo de aminoácido	Zea mays	NP_001105896	285	24918/5,40		3
	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (EC 2.7.7.9)	SCRLSB1041A01.g	Bioenergia	Saccharum officinarum	ACL80329	166	24077/4,83		3
32	Actin-depolymerizing factor 3	SCCCAM1C08A05.g	Dinamica celular	Zea mays	NP_001146959	165	23740/7,07	6/5,12	2
	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14)	SCCCAM2C07H01.g	Metabolismo de aminoácido	Sorghum bicolor	AF466201_8	87	240007,03		2

Tabela 11 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

(continuação)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
33	Glutamine synthetase shoot isozyme (EC 6.3.1.2) (Glutamate--ammonia ligase)	SCEZAD1C08B10.g	Bioenergia	Saccharum officinarum	AAW21273	1453	34446/6,43	32/5,56	11
	Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming] (EC 2.4.1.112)	SCAGAM2017G12.g	Dinamica celular	Zea mays	NP_001105598	521	24014/5,30		8
36	14-3-3-like protein	SCCCT3002A02.g	Dinamica celular	Saccharum officinarum	AAP48904	1001	33078/4,83	5/6,17	11
	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (EC 2.7.7.9)	SCEQAM1042B05.g	Bioenergia	Saccharum officinarum	AAP48905	263	29250/9,07		3
	Enolase 1 (EC 4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase 1)	SCJFHR1C03D04.b	Metabolismo de aminoácido	Zea mays	NP_001105896	243	20504/5,70		3
46	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (EC 3.6.3.14)	SCMCRT3085F12.g	Bioenergia	Zea mays	ACG48688	652	25242/5,37	9/6,25	5
	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 4A (EC 1.15.1.1)	SCCCLR2C03D05.g	Resposta ao estresse	Zea mays	NP_001105704	82	28579/8,84		2

Tabela 11 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

(continuação)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
49	Heat shock protein 17.9	SCQGLR2010G12.g	Metabolismo de proteínas	Pennisetum glaucum	ACR78191	227	33307/10,06	9/6,40	4
	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (EC 3.6.3.14)	SCCCLV1003A12.g	Transporte	[Oryza sativa Indica Group	ABR25443	155	229077,98		2
50	Heat shock protein 17.9	SCQGLR2010G12.g	Metabolismo de proteínas	Zea mays	ACG35098	537	33307/10,06	9/5,89	6
	S-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase (EC 2.1.1.-)	SCCST3C09H09.g	Metabolismo secundário	Cleistogenes songorica	ADC45384	118	27185/7,29		5
53	Glutamine synthetase shoot isozyme (EC 6.3.1.2)	SCVPHR1093B09.g	Bioenergia	Saccharum officinarum	AAW21273	397	28861/10,16	11/5,22	5
	14-3-3-like protein	SCJFRT1008E09.g	Comunicação celular/Transdução de sinais	Saccharum hybrid cultivar CP65-357	AAP48904	209	34524/5,32		4
	Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming] (EC 2.4.1.112)	SCRFFL1026B10.g	Dinamica celular	Zea mays	NP_001105598	143	26040/6,57		2
57	Actin	SCCCLR1069D05.g	Dinamica celular	Zea mays	AAB40105	182	23099/5,17	13/5,97	3

Tabela 11 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

(continuação)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
	Transcription factor BTF3b	SCCCLB1C04D06.g	Metabolismo de RNA	Zea mays	NP_001171337	121	22083/8,95		3
65	Peptide methionine sulfoxide reductase (EC 1.8.4.6)	SCSBSD1029F02.g	Resposta ao estresse	Zea mays	NP_001150352	709	26780/9,14	19/5,63	3
	14-3-3-like protein	SCQGFL4072B04.g	Comunicação celular/Transdução de sinais	Saccharum hybrid cultivar CP65-357	AAP48904	123	33822/6,41		2
70	Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11)	SCVPFL1131H12.g	Resposta ao estresse	Zea mays	NP_001152746	1072	30113/9,01	21/5,66	4
	Proteasome subunit alpha type 2 (EC 3.4.25.1) (20S proteasome alpha subunit B)	SCCCSB1001B06.g	Metabolismo de proteínas	Zea mays	ACG33652	773	25345/8,84		6
	Dehydroascorbate reductase	SCSGLR1045H09.g	Resposta ao estresse	Puccinellia tenuiflora	ADK92881	135	25535/8,71		2
71	Glutathione S-transferase I (EC 2.5.1.18)	SCACLR1036E11.g	Resposta ao estresse	Zea mays	NP_001105412	697	26079/5,91	21/5,60	4
	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (EC 3.6.3.14)	SCCCLV1003A12.g	Transporte	Oryza sativa Indica Group	ABR25443	190	22907/7,98		2
	Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11)	SCCCAM2C07D01.g	Resposta ao estresse	Zea mays	NP_001152746	140			2

Tabela 11 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

(continuação)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
73	Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11)	SCVPFL3046A09.g	Resposta ao estresse	Zea mays	NP_001152746	1066	33492/8,83	22/6,14	10
	Superoxide dismutase [Mn] 3.4, mitochondrial precursor (EC 1.15.1.1)	SCJFRT1009A12.g	Resposta ao estresse	Saccharum officinarum	ACT53877	238	25971/6,78		3
78	Cytosolic ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11)	SCEZLB2066C02.g	Resposta ao estresse	Zea mays	NP_001105500	534	25806/4,98	23/5,22	6
	Vacuolar ATP synthase subunit B isoform 1 (EC 3.6.3.14)	SCVPFL3045C09.g	Dinamica celular	Zea mays	NP_001152665	136	35854/5,11		3
80	6-phosphogluconolactonase-like protein	SCJLFL3018C01.g	Bioenergia	Oryza brachyantha	ABG73467	1021	24584/5,27	24/5,09	9
	Glutamic-acid and lysine rich protein	SCCCST3C07C11.g	Comunicação celular/Transdução de sinais	Zea mays	ADV56677	142	24862/7,07		3
93	Glyoxalase I	SCJFRZ2014A06.g	Resposta ao estresse	Zea mays	NP_001105217	396	35599/7,66	27/5,68	4
	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplast precursor (EC 4.1.2.13)	SCCCSD1C03D01.g	Bioenergia	Zea mays	ACG36798	267	27707/8,89		2
	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor (OEE1)	SCRLAD1041A04.g	Bioenergia	Zea mays	ACG31595	162	19251/4,70		2

(continuação)

<i>Spot</i>	<i>Nome</i>	<i>Acesso (SUCEST)</i>	<i>Categoria funcional</i>	<i>Organismo</i>	<i>Acesso (NCBI)</i>	<i>Score</i>	<i>PM/pi teórico</i>	<i>PM/pi exp (kDa)</i>	<i>Número de peptídeos</i>
108	NADP-dependent oxidoreductase P1 (EC 1.3.1.74)	SCBGSB1026D06.g	Bioenergia	Zea mays	NP_001152093	184	22269/5,97	31/5,40	3
	Adenosine kinase 2 (EC 2.7.1.20)	SCRLAD1099C03.g	Metabolismo de nucleotídeos	Zea mays	CAB40376	118	25076/6,15		2
113	Glutamine synthetase shoot isozyme (EC 6.3.1.2)	SCEZAD1C08B10.g	Bioenergia	Saccharum officinarum	AAW21273	1620	34446/6,43	32/5,42	12
	14-3-3-like protein	SCCCT3002A02.g	Comunicação celular/Transdução de sinais	Saccharum hybrid cultivar CP65-357	AAP48904	383	33078/4,83		4
	Caffeic acid 3-O-methyltransferase (EC 2.1.1.68)	SCCCT1C05C02.g	Resposta ao estresse	Saccharum hybrid cultivar	AAQ67347	161	23882/4,93		4
117	S-adenosylmethionine synthetase 1 (EC 2.5.1.6) (Methionine adenosyltransferase 1)	SCJFST1009E03.g	Comunicação celular/Transdução de sinais	Zea mays	ACG42196	474	30739/5,26	32/5,22	7
	NADP-dependent oxidoreductase P1 (EC 1.3.1.74)	SCBGSB1026D06.g	Bioenergia	Zea mays	NP_001152093	348	22269/5,97		3
	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	SCJFRZ3C01C05.g	Bioenergia	Zea mays	ACG36184	140	22991/9,41		2

Tabela 11 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

(continuação)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
119	Adenosine kinase 2 (EC 2.7.1.20) (AK 2) (Adenosine 5'-phosphotransferase 2)	SCSGFL4196H01.b	Metabolismo de nucleotídeos	Zea mays	CAB40376	1078	25395/6,12	33/5,76	8
	Glutamine synthetase shoot isozyme (EC 6.3.1.2)	SCVPHR1093B09.g	Bioenergia	Saccharum officinarum	AAW21273	98	28861/10,16		2
	Caffeic acid 3-O-methyltransferase (EC 2.1.1.68)	SCCCLR1C06B06.g	Resposta ao estresse	Saccharum hybrid cultivar	AAQ67347	84	25050/6,47		2
123	Adenosine kinase 2 (EC 2.7.1.20)	SCRLFL3004F11.b	Metabolismo de nucleotídeos	Oryza sativa Japonica Group	AAO72629	564	19904/8,35	34/5,56	5
	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1) (Transaminase A)	SCPIRT3024F04.g	Metabolismo de aminoácido	Volvox carteri	XP_002948580	269	25169/5,54		5
	40S ribosomal protein SA (p40)	SCSBFL1041G08.g	Metabolismo de proteínas	Zea mays	ACG27786	87	27673/8,96		2
132	Actin	SCACLB1047F01.g	Comunicação celular/Transdução de sinais	Hordeum vulgare	AAN59956	999	24507/5,11	36/5,12	7
	Transaldolase (EC 2.2.1.2)	SCCCCL3002D02.b	Bioenergia	Dimocarpus longan	ACK56136	114	30102/8,81		2

Tabela 11 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

(continuação)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
134	Actin	SCAGLB2046A12.g	Dinamica celular	Setaria italica	AF288226_1	1104	23036/4,72	36/5,68	3
	Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11)	SCCCAD1002E12.g	Resposta ao estresse	Zea mays	NP_001152746	467	23748/9,72		4
148	Enolase 1 (EC 4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase 1)	SCCART1001E02.g	Metabolismo de aminoácido	Zea mays	NP_001105896	1308	24918/5,40	42/5,92	8
	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)	SCJLLB2076H02.g	Transporte	Zea mays	NP_001151807	923	30206/5.31		7
	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (EC 2.7.7.9)	SCVPFL1134D02.g	Bioenergia	Saccharum officinarum	ACL80329	895	29074/4,95		8
150	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)	SCCCLB1004B02.g	Transporte	Sorghum bicolor	YP_762326	965	22779/6,93	42/5,47	6
	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase (EC 2.3.1.12)	SCQSAM2046F06.g	Dinamica celular	Zea mays	NP_001150860	135	23105/9,54		6
152	ATP synthase alpha chain, mitochondrial (EC 3.6.3.14)	SCCCLB1004B02.g	Transporte	Sorghum bicolor	YP_762326	745	22779/6,93	43/5,42	6
	Phosphoglycerate kinase, cytosolic (EC 2.7.2.3)	SCJFRZ3C07A12.g	Bioenergia	Oryza sativa	ABI74567	215	23828/4,87		3

Tabela 11 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit* (continuação)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
170	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (EC 3.6.3.14)	SCBGST3105G04.g	Transporte	Zea mays	ACG48688	1045	23915/5,24	51/5,40	12
	Tubulin beta-7 chain	SCJLHR1025F02.g	Dinamica celular	Zea mays	ACG35721	226	23972/5,45		2
171	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (EC 3.6.3.14)	SCEZRZ3053E05.g	Transporte	Zea mays	ACG48688	817	35037/9,05	51/5,63	10
	Tubulin beta-4 chain	SCCCLR1C10A02.g	Dinamica celular	Zea mays	ACG32188	188	25576/9,17		5
172	vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	SCCCRZ1004A01.g	Transporte	Zea mays	ACG48688	1556	25167/5,47	51/5,55	11
	Phosphoglucomutase, cytoplasmic 2 (EC 5.4.2.2) (Glucose phosphomutase 2)	SCJFST1014C03.g		Zea mays	NP_001105405	221	25031/4,68		3
176	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor	SCCCTR1003C07.g	Metabolismo de proteínas	Zea mays	NP_001151739	933	25489	54/5,27	10
	Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11)	SCCCAD1002E12.g	Resposta ao estresse	Zea mays	NP_001152746	420	23748/9,72		2
	Phosphoglucomutase, cytoplasmic 2 (EC 5.4.2.2) (Glucose phosphomutase 2)	SCJFST1014C03.g	Bioenergia	Zea mays	NP_001105405	150	25031/4,68		3

Tabela 11 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

(continuação)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
182	Heat shock cognate 70 kDa protein	SCVPLB2C03C12.g	Metabolismo de proteínas	Oryza sativa	ACJ54890	195	24895/5,18	61/5,78	3
	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (EC 3.6.3.14)	SCEQRZ3089G08.g	Transporte	Zea mays	ACG48688	188	23913/5,36		3
194	S-adenosylmethionine synthetase (EC 2.5.1.6) (Methionine adenosyltransferase)	SCEQSB1C07H07.g	Metabolismo de aminoácido			177	34317/5,84	41/6,36	3
	Argininosuccinate synthase (EC 6.3.4.5) (Citrulline--aspartate ligase)	SCJLRT1016A08.g	Metabolismo de aminoácido	Zea mays	ACG38001	134			2
	Cytosolic 6-phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.44)	SCBFAD1045C12.g	Bioenergia	Zea mays	NP_001104911	130	24776/7,08		6
196	Isoflavone reductase homolog IRL (EC 1.3.1.-)	SCCCST2003G12.g	Comunicação celular/Transdução de sinais	Zea mays	NP_001150952	347	24014/8,58	24/4,97	4
	glutamic-acid and lysine rich protein	SCCCLB2008E03.g	Comunicação celular/Transdução de sinais	Zea mays	ADV56677	246	23992/8,76		4
203	Tubulin beta-4 chain	SCAGHR1016E02.g	Dinamica celular	Zea mays	NP_001105458	1039	25494/6,49	49/6,18	14

Tabela 11 - Proteínas diferencialmente expressas entre os internós maduro I9 de 10 meses e internós maduro I9 de 7 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

(conclusão)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	SCVPFL4C11D01.g	Resposta ao estresse			364	32788/9,16		4

ANEXO M

Tabela 12 - Proteínas preferencialmente expressas nos internós maduro I9 de 10 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit* (continua)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
681	Tubulin alpha-1 chain	SCVPFL1133B11.g	Dinamica celular	Populus trichocarpa	XP_002307960	1274	33562/6,38	14/5,47	11
	Nucleoside diphosphate kinase I (EC 2.7.4.6)	SCRLSD1009E10.b	Dinamica celular	Lolium perenne	AF271362_1	210	22936/7,04		3
682	40S ribosomal protein S12	SCCCLR1C01C07.g	Metabolismo de proteínas	Zea mays	ACG23934	855	24834/5,52	16/5,17	4
	RuBisCO subunit binding-protein alpha subunit, chloroplast precursor	SCBFLR1005H07.g	Metabolismo de proteínas	Oryza sativa Japonica Group	ABG00012	175	26193/4,76		2
685	CBS domain protein	SCJFHR1C05A10.g	Metabolismo de nucleotídeos	Zea mays	NP_001150216	713	28863/9,24	21/5,85	8
	Protein mago nashi	SCCCAM2C09C04.g	Crescimento e desenvolvimento vegetal	Zea mays	ACG28070	345	24655/8,87		6
689	Wali7	SCEZHR1088F05.g	Bioenergia	Triticum aestivum	AAC37416	909	24550/9,23	25/5,27	6
	Triosephosphate isomerase, cytosolic (EC 5.3.1.1) (TIM)	SCCCAM1C02H06.g	Bioenergia	Zea mays	ACG24648	197	23132/6,00		2

Tabela 12 - Proteínas preferencialmente expressas nos internós maduro I9 de 10 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

(continuação)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
690	Soluble inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) (Pyrophosphate phospho-hydrolase)	SCSF8045F05.g	Bioenergia	Zea mays	NP_001104889	681	26139/6,02	26/5,23	9
	Cytosol aminopeptidase (EC 3.4.11.1) (Leucine aminopeptidase)	SCRUFL1016C04.g	Metabolismo de proteínas	Petroselinum crispum	CAA68143	315	20195/7,18		3
	Pyruvate orthophosphate dikinase (EC 2.7.9.1)	SCAGSD1043B05.g	Bioenergia	Zea mays	ACR78553	311	24922/4,97		3
694	Aldose reductase	SCAGFL8008E11.g	Resposta ao estresse	Zea mays	ACG39768	544	26005/7,08	31/6,10	4
	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2 (eIF-3 beta)	SCVPHR1089H02.g	Dinamica celular	Zea mays	NP_001147501	285	25965/6,15		2
695	DREPP protein	SCCCSB1003A04.g		Arabidopsis thaliana	NP_193759	431	21940/5,56	31/4,77	4
	Serine/threonine protein phosphatase PP2A-3 catalytic subunit (EC 3.1.3.16)	SCCCST3C08G08.g	Comunicação celular/Transdução de sinais	Zea mays	ACG37926	134	25352/6,77		2
699	Spermidine synthase 1 (EC 2.5.1.16) (Putrescine aminopropyltransferase 1)	SCQGRZ3014G03.g	Metabolismo de aminoácido	Lotus japonicus	CAM35497	1079	28138/5,10	32/5,03	11
	Fructokinase-2	SCEZST3151G03.g	Bioenergia	Zea mays	NP_001105211	233	24571/6,25		4

Tabela 12 - Proteínas preferencialmente expressas nos internós maduro I9 de 10 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

(continuação)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
701	L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27)	SCEQSD1076G05.g	Bioenergia	Zea mays	NP_001148884	459	21071/6,48	34/6,12	4
	Phenylalanine ammonia-lyase (EC 4.3.1.5)	SCCCRT1C02G09.g	Resposta ao estresse	Saccharum officinarum	ABM63378	86	21365/6,66		2
705	TGF-beta receptor-interacting protein 1	SCUTSD2087H10.g	Dinamica celular	Zea mays	NP_001147501	778	18774/5,83	35/6,76	6
	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase (EC 1.2.1.38)	SCSBAD1084H04.g	Bioenergia	Populus maximowiczii x Populus nigra	ACQ66328	361	25782/6,63		5
	Glutathione S-transferase GST 14 (EC 2.5.1.18)	SCCCLB1C02A04.g	Resposta ao estresse	Zea mays	ACG41887	260	24935/6,67		6
706	Arginase (EC 3.5.3.1)	SCCCCL7C04G11.g	Metabolismo de aminoácido	Arabidopsis thaliana	NP_192629	174	29098/5,66	35/6,07	2
	S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase	SCJLHR1028E06.g	Metabolismo secundário	Zea mays	NP_001149207	98	36280/6,88		2
709	Formate dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.2.1.2)	SCCCLR1C02A03.g	Bioenergia	Zea mays	ACG39798	1176	28531/6,28	37/6,73	8
	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme (EC 4.1.2.13)	SCEQRT3C03B01.g	Bioenergia	Zea mays	NP_001150049	247	25263/5,67		3

Tabela 12 - Proteínas preferencialmente expressas nos internós maduro I9 de 10 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*
(continuação)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
719	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I, chloroplast precursor (EC 2.3.1.41)	SCVPFL1135C05.g	Metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isoprenóides	Zea mays	NP_001149639	250	32847/6,91	41/6,63	3
	Polyubiquitin	SCEZAD1C03E07.g	Metabolismo de proteínas	Oryza sativa	CAD27944	207	28548/8,43		2
	NADP-specific isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42)	SCCCHR1001H07.g	Bioenergia	Passiflora edulis	BAG84436	196	25634/5,79		3
726	Tubulin alpha-6 chain	SCBFFL4115A05.g	Dinamica celular	Alopecurus aequalis	BAJ06363	1084	25410/6,65	42/5,10	14
	Enolase 1 (EC 4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase 1)	SCCART2C03F04.g	Metabolismo de aminoácido	Zea mays	NP_001105896	81	25871/9,89		2
727	Alpha tubulin	SCMCRT2107H03.g	Dinamica celular	Alopecurus aequalis	BAJ06364	1215	22770/5,17	43/6,08	6
	Glutamate decarboxylase (EC 4.1.1.15)	SCSBSB1050B09.g	Metabolismo de aminoácido	Zea mays	ABZ88153	115	25017/5,63		2
737	Dihydrolipoamide dehydrogenase precursor (EC 1.8.1.4)	SCCCFL5061H09.g	Bioenergia	Solanum lycopersicum	AAN23154	379	14902/8,48	47/6,64	4
	Polyphenol oxidase (EC 1.10.3.1)	SCRFR3057D06.g	Bioenergia	Saccharum hybrid cultivar	AAB94293	324	28279/6,40		2

Tabela 12 - Proteínas preferencialmente expressas nos internós maduro I9 de 10 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

(continuação)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp (kDa)	Número de peptídeos
741	Betaine aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.8)	SCBGRT3012C06.g	Bioenergia	Zea mays	NP_001105781	1117	23061/4,93	48/5,18	10
	Importin alpha 2 subunit (NLS receptor)	SCEQSB1016D02.g	Transporte			267	299284,92		3
744	NADP-dependent malic enzyme (EC 1.1.1.40)	SCEPSB1131H06.g	Bioenergia	Arthraxon lanceolatus	CAZ48467	569	24955/5,14	48/6,02	5
	Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic 1 (EC 6.1.1.22)	SCBGSB1026D09.g	Metabolismo de proteínas	Zea mays	ACG28959	447	27513/7,88		3
	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95) (PGDH)	SCCCFL4001E11.g	Bioenergia	Zea mays	NP_001147127	282	21392/5,13		2
751	Polyphenol oxidase (EC 1.10.3.1)	SCJLRT3076A04.g	Metabolismo secundário	Saccharum hybrid cultivar	AAB94293	2081	25815/6,77	52/6,78	12
	Stress-induced protein STI1-like protein	SCCCAM2C07D11.g	Metabolismo do DNA	Dactylis glomerata	ADA68360	162	24202/8,01		3
754	Translational elongation factor Tu	SCBGLR1044F05.g	Metabolismo de proteínas			298	16984/10,84	54/6,06	3
	Lysyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.6)	SCCCAM2C07F03.g	Metabolismo de RNA	Zea mays	NP_001146902	242	24987/8,23		2
	Xaa-Pro aminopeptidase 2 (EC 3.4.11.9)	SCCCST3C08E08.g	Metabolismo de proteínas	Zea mays	NP_001151433	88	25299/5,86		2

Tabela 12 - Proteínas preferencialmente expressas nos internós maduro I9 de 10 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

(conclusão)

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pl teórico	PM/pl exp (kDa)	Número de peptídeos
764	Cytosol aminopeptidase (EC 3.4.11.1) (Leucine aminopeptidase) (LAP)	SCJLRZ1019F07.g	Metabolismo de proteínas	Arabidopsis thaliana	NP_179997	671	24323/5,21	62/6,17	4
	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)	SCCCHR1001A12.g	Transporte	Zea mays	NP_001105340	303	24025/5,43		8
768	Aconitate hydratase, cytoplasmic (EC 4.2.1.3) (Citrate hydro-lyase)	SCJFLL1C02C10.g	Bioenergia	Zea mays	NP_001147431	321	26149/8,20	63/6,21	5
	Elongation factor EF-2	SCSBAD1084H08.g	Resposta ao estresse			201	25397/4,94		3
770	Tubulin alpha-6 chain	SCSFHR1046C09.g	Dinamica celular	[Alopecurus aequalis	BAJ06363	1016	24710/5,95	63/6,60	5
	Elongation factor EF-2	SCJFAM1066A05.g	Resposta ao estresse	Arabidopsis thaliana	AC009894_8	577	30248/9,25		7
799	Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase beta subunit (EC 2.7.1.90)	SCCCFL5093F08.g	Bioenergia	Citrus sinensis	ABY25306	786	26229/6,77	49/6,41	6
	Polyphenol oxidase, chloroplast precursor (EC 1.10.3.1) (PPO) (Catechol oxidase)	SCEQRT3C08F03.g	Resposta ao estresse	Saccharum hybrid cultivar	AAB94293	399	27574/9,03		4

ANEXO N

Tabela 13 - Proteínas preferencialmente expressas nos internós maduro I9 de 7 meses. Proteínas identificadas com mais de um *hit*

<i>Spot</i>	Nome	Acesso (SUCEST)	Categoria funcional	Organismo	Acesso (NCBI)	Score	PM/pi teórico	PM/pi exp (kDa)	Número de peptídeos
2093	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein (GPB-LR)	SCJFST1048F06.g	Metabolismo de RNA	Nicotiana plumbaginifolia	CAA96528	416	30603/8,61	30/6,44	6
	Aldose reductase	SCCCLB1024B01.g	Resposta ao estresse	Zea mays	ACG39768	334			4
2097	17.5 kDa class II heat shock protein	SCCCST1C01H05.g	Metabolismo de proteínas	Zea mays	NP_001105705	576	24909/10,68	8/5,76	4
	50S ribosomal protein L6	SCRLLV1027G03.g	Metabolismo de proteínas	Zea mays	NP_001148555	132	23710/9,41		2
2106	Proteasome subunit alpha type 5 (EC 3.4.25.1) (20S proteasome alpha subunit E)	SCQGST3126B12.g	Metabolismo de proteínas	Zea mays	NP_001149918	397	27821/4,82	23/4,69	5
	Eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF-6) (B4 integrin interactor)	SCSGFL4C03E04.g	Metabolismo de proteínas	Zea mays	NP_001148947	243	25335/5,09		3