**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

RODRIGO FANDIÑO DE ANDRADE

**Clonagem de promotores de cana-de-açúcar e
análise do transcriptoma de genótipos
segregantes para teor de sacarose**

Versão corrigida da dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

15/08/2012

RODRIGO FANDIÑO DE ANDRADE

**Clonagem de promotores de cana-de-açúcar e
análise do transcriptoma de genótipos
segregantes para teor de sacarose**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Glaucia Mendes Souza

São Paulo

2012

Rodrigo Fandiño de Andrade

Clonagem de promotores de cana-de-açúcar e análise do transcriptoma de genótipos segregantes para teor de sacarose

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

A meus avós queridos e já falecidos,

José Romero Fandiño e Maria del Carmen Mira Rey de Romero

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo o apoio em minha vida, desde o simples ao complexo, em especial à minha querida mãe, que me acompanha até hoje em minha vida, graças a Deus.

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização de uma Pós-Graduação gratuita e de qualidade.

Não poderia deixar de agradecer ao CNPq pela bolsa de mestrado, bem como a FAPESP pelo apoio financeiro aos projetos.

Ao Instituto de Química, pela infraestrutura, física e social. Ao Departamento de Bioquímica, professores, funcionários e colegas de Pós-Graduação pela boa convivência e ensinamentos.

À Prof. Dra. Gláucia Mendes Souza pelo incentivo e por todo o apoio, assim como a sensibilidade quando de meus momentos mais difíceis.

Ao pessoal do laboratório: Abdalla Almeida, Alessandra Paiva, Carlos Hotta, Carolina Lembke, Edwin, Érica Bandeira, Luciana Mantzouranis, Paloma Sato, Roberta Álvares, Maximiller dal-Bianco Lamas, Sávio Ferreira, Sideny e Milton Yutaka Jr. Agradeço por toda a ajuda, pelas discussões científicas e pelos papos informais.

Agradecimento mais do que especial a Milton Yutaka Nishiyama Jr. e Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa, companheiros de análises científicas e de convívio de república por muitos anos. Foram sempre muito especiais para mim, pela amizade verdadeira.

A todos os funcionários do Instituto de Química, que contribuíram para a minha formação.

E a todos que não tenha citado, mas que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

RESUMO

Andrade, R. F. **Clonagem de promotores de cana-de-açúcar e análise do transcriptoma de genótipos segregantes para teor de sacarose**. 2012. 89p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A cana-de-açúcar é uma gramínea com fotossíntese do tipo C₄, com capacidade de acumular sacarose nos colmos em quantidades que excedem 50% de seu peso seco, característica única no reino vegetal (Moore, 1995). Sacarose e seu derivado mais importante, etanol, são dois produtos de grande importância mundial. Assim, o teor de sacarose em cana tem fundamental importância no aumento da produtividade dessas duas commodities.

O melhoramento clássico parece ter alcançado seu limite, já que incrementos expressivos no teor de sacarose em novas variedades não têm sido observados e tudo aponta para a necessidade de estudos que levem a uma maior compreensão dos mecanismos moleculares associados à produção, transporte e acúmulo de sacarose em cana (Casu *et al.*, 2005; Moore, 1995).

Procurar seqüências promotoras de genes de interesse é importante para a obtenção de transgênicos, já que promotores constitutivos não apresentam resultados satisfatórios em cana (Lakshmanan *et al.*, 2005). É também objetivo aqui hibridar mRNA de genótipos de cana-de-açúcar com segregação para acúmulo de sacarose, em uma plataforma customizada de oligos (*Agilent*), com aproximadamente 44k elementos, que compõe uma representatividade gênica não alcançada em esforços anteriores com microarranjos de cDNA.

Genome walking foi a técnica utilizada na obtenção de regiões à montante do primeiro éxon, predito *in silico*, para três proteínas quinase de interesse,

SASGMS11561, SASGMS16343 e SASGMS09047, que se mostraram moduladas em experimentos anteriores de hibridação com amostras segregantes para conteúdo de sacarose. Foi obtido sucesso nos três casos, tendo os fragmentos de DNA sido seqüenciados e oportunamente alinhados à montante dos correspondentes genes ortólogos em sorgo, bem como ao banco ainda em construção de *contigs* do genoma de cana-de-açúcar, obtidos por *shotgun*.

A plataforma *Agilent*, com seus 43803 SAS únicos, mostrou-se uma ferramenta muito adequada para as hibridações de genótipos de mais alto Brix contra genótipos de mais baixo Brix. Um total de 569 genes diferencialmente expressos foram obtidos em pelo menos uma das três hibridações realizadas. Um grupo de genes, de diferentes categorias e perfis de modulação, foi validado por PCR em tempo real, obtendo uma taxa de aproximadamente 90%. Apesar do grande número de SAS diferencialmente expressos, por volta de 70% dos mesmos ainda se encontram não categorizados, seja por falta de similaridade de seqüência em bancos de dados de organismos próximos ou pela alta complexidade e esforço prático na cura desse processo de categorização manual.

Assim, três fragmentos de seqüências promotoras para três proteínas quinase de interesse foram obtidos e seqüenciados, como parte dos esforços do grupo em formar um catálogo de promotores específicos para cana-de-açúcar. Um grupo de genes foi analisado dos resultados das hibridações por seus papéis relevantes nos processos que levam ao maior teor de sacarose em cana, devidamente corroborados por trabalhos do próprio grupo, bem como de outros.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, sacarose, promotores, transcriptoma, quinases (proteínas quinase), hibridação.

ABSTRACT

Andrade, R. F. **Cloning of sugarcane promoters and transcriptome analysis of genotypes segregating for sugar content.** 2012. 89p. Masters Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sugarcane is a C₄ plant with the unique characteristic of being capable of accumulating sucrose in its culms in quantities that exceed 50% of its dry weight (Moore, 1995). Sucrose and ethanol are highly valued products in the world of today. Sucrose content is a trait with fundamental importance in the on-going process of increasing productivity of these two sugarcane byproducts.

Classic improvement of sugarcane seems to have reached its practical limits, given that it has become increasingly harder to obtain varieties with increased sugar content. This obstacle points towards the necessity of better comprehension of the molecular mechanisms associated to the production, transport and accumulation of sucrose in sugarcane (Casu *et al.*, 2005; Moore, 1995).

The search for promoter sequences of genes of interest is crucial for the production of transgenic lines, since the use of constitutive promoters in sugarcane has been highly problematic, leading to unsatisfactory results in most cases (Lakshmanan *et al.*, 2005). Another objective was to hybridize sugarcane genotypes with contrasting sugar content in a customized Agilent oligo platform, containing approximately 44k elements, which signifies the best effort so far regarding gene representativeness.

Genome walking was the chosen technique to obtain upstream regions of the first *in silico* predicted exon of three proteins kinases of interest, SASGMS11561, SASGMS16343 and SASGMS09047, all of them selected from previous hybridization

experiments with contrasting sucrose content samples. Success was achieved in all three cases, and the obtained fragments were sequenced and aligned to their respective syntenic region on the sorghum genome as well as on contigs from an increasingly larger bank of genomic sugarcane sequences, from our group, which has been acquired using the shotgun sequencing method.

The Agilent platform, with its 43803 unique sugarcane assembled sequences (SAS), has proven valuable as a powerful high scale tool for the hybridization of genotypes with contrasting Brix values (high versus low Brix). A total of 569 differentially expressed genes were obtained from at least one of the three experiments accomplished. A group of genes from different categories and modulation profiles was depicted and validated through real time PCR, with an approximate validation rate of 90%. Although the number of differentially expressed genes is high, around 70% of them is still uncategorized, mostly because of their unique identity and therefore lack of reference organisms to compare with and the high complexity and laboriousness of categorizing them manually.

In summary, three promoter fragments from three different protein kinases of interest were obtained and sequenced, as a part of a greater effort to create a sugarcane promoter sequence catalogue. From the hybridization assays, a group of genes were analyzed, due to their putative importance in the processes that lead to a higher sucrose content in sugarcane, also corroborated by previous studies from our group as well as from others.

Keywords: sugarcane, promoters, transcriptome, kinases (protein kinases) and hybridization.

SUMÁRIO

	p.
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Obtenção de genótipos contrastantes para o teor de sacarose (°Brix)	24
3.2. Conteúdo de sólidos solúveis (Brix)	25
3.3. Clonagem de promotores por <i>Genome Walking</i>	25
3.4. Condução dos experimentos para avaliação do transcriptoma associado ao Brix	28
3.5. Coleta de amostras para Biologia Molecular	28
3.6. Extração de RNA e tratamento com DNase	29
3.7. Síntese de cDNA	30
3.8. Reações de PCR em tempo real	31
3.9. Obtenção das sondas, hibridação nos microarranjos de oligonucleotídeos e análise dos dados	32
3.10. Técnicas padrões de Biologia Molecular	33
4. RESULTADOS	
4.1. Varredura <i>in silico</i> de seqüências à montante de proteínas quinase de interesse	34
4.2. Clonagem de seqüências de regiões promotoras por <i>Genome Walking</i> (GW)	36
4.3. Hibridação de amostras segregantes para teor de sacarose na plataforma <i>Agilent</i> de chip de oligos	45
4.3.1. Escolha das amostras utilizadas na hibridação	45
4.3.2. Resultados obtidos a partir das três hibridações realizadas	50

5. DISCUSSÃO

5.1. Busca por regiões promotoras como parte dos esforços na montagem de um catálogo de promotores para cana-de-açúcar	64
5.1.1. Uso de BACs na busca por seqüências promotoras	66
5.1.2. Seqüenciamento de regiões promotoras via <i>genome walking</i>	67
5.2. Hibridação de amostras segregantes para conteúdo de sacarose no chip de oligos <i>Agilent</i>	68
5.2.1. Dados de expressão relevantes provenientes das hibridações na plataforma <i>Agilent</i> de oligos	70

6. CONCLUSÕES	81
----------------------	----

7. REFERÊNCIAS	83
-----------------------	----

LISTA DE ANEXOS

Tabela XI (CD-ROM)	(p.1-p.57)
--------------------	------------

LISTA DE FIGURAS

	p.
Figura 1	18
Figura 2	39
Figura 3	40
Figura 4	41
Figura 5	41
Figura 6	45
Figura 7	47
Figura 8	48
Figura 9	49
Figura 10	50
Figura 11	53
Figura 12	54
Figura 13	55
Figura 14	59
Figura 15	60
Figura 16	61
Figura 17	62
Figura 18	69
Figura 19	70
Figura 20	75
Figura 21	77
Figura 22	78
Figura 23	79

LISTA DE TABELAS

	p.
Tabela I	35
Tabela II	39
Tabela III	51
Tabela IV	51
Tabela V	56
Tabela VI	58
Tabela VII	69
Tabela VIII	72
Tabela IX	73
Tabela X	74

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma gramínea com fotossíntese do tipo C4 capaz de acumular grandes quantidades de açúcar em seu colmo, provendo por volta de 70% da sacarose consumida no mundo (<http://www.unica.com.br/>). Os cultivares modernos de cana-de-açúcar possuem a capacidade de estocar em média de 12 a 17% de açúcares totais em relação ao seu peso fresco, podendo atingir 40%, do qual 90% é sacarose e 10% glicose ou frutose (Wheals *et al.*, 2001). Além do açúcar, o etanol obtido por vias fermentativas vem aumentando a importância sócio-econômica dessa cultura, muito em virtude da sustentabilidade na utilização desse composto como combustível.

A análise em larga escala da expressão gênica aplicada a populações segregantes foi aplicada à cana, uma estratégia introduzida por Jansen and Nap (Jansen and Nap, 2001). Utilizando microarranjos, genes associados ao acúmulo de sacarose foram identificados ao se comparar genótipos de alto Brix e de baixo Brix, sendo Brix uma medida total de sólidos solúveis (Papini-Terzi *et al.*, 2007; Papini-Terzi *et al.*, 2009; Casu *et al.*, 2005). Em um desses estudos identificaram-se vinte e três proteínas quinase (PKs) e proteínas fosfatase (PPases) associadas ao Brix com prevalência de famílias reguladas por cálcio e ABA e envolvidas em resposta a estresse (Papini-Terzi *et al.*, 2007). Além da avaliação do padrão de expressão dos entrenós de cana, a análise das progênies contrastantes para Brix também se estendeu às folhas, tecido fonte de sacarose (Felix, 2006; Rocha, 2006).

Estudos apontam para a relação da família das SNF-related protein kinases de plantas (SnRKs), relacionadas à proteína quinase sacarose não fermentadora de levedura (SNF1), com o processo de acúmulo de sacarose (Papini-Terzi *et al.*, 2007; Papini-Terzi *et al.*, 2009; Halford and Hardie, 1998). Em levedura, SNF1 é

responsável por modular a expressão de genes que codificam para enzimas do metabolismo de carboidratos, bem como a atividade de várias enzimas metabólicas (Woods *et al.*, 1994). De maneira análoga a SNF1, as SnRK1s de plantas regulam o metabolismo de carbono através do controle da expressão gênica e diretamente, regulando a atividade de algumas enzimas como a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (Barker *et al.*, 1996), a sacarose fosfato sintase (Sudgen *et al.*, 1999) e a nitrato redutase (Douglas *et al.*, 1997).

As proteínas quinase de cana-de-açúcar foram categorizadas utilizando-se uma abordagem filogenética e três grupos de quinases similares a SNF1 foram identificados, SnRK1, SnRK2 e SnRK3, dentre os quais SnRK1 é o mais similar a SNF1 de levedura. SnRK2 e SnRK3 compõem famílias presentes apenas em plantas (Rocha *et al.*, 2007; Halford and Hardie, 1998). Ademais, estudos apontam para uma provável relação direta entre acúmulo de sacarose e modulação gênica, já que um gene para uma SnRK1 foi identificado como menos expresso nos entrenós maduros de plantas de alto Brix e foram também identificadas proteínas 14-3-3 menos expressas (Papini-Terzi *et al.*, 2009). Uma proteína 14-3-3, junto de uma SnRK1, fosforila e inibe a enzima sacarose fosfato sintase SPS *in vitro* (Sugden *et al.*, 1999; Toroser *et al.*, 1998) o que pode indicar que a diminuição dos níveis desses genes permita um aumento no acúmulo de sacarose nos colmos. Membros das SnRK2 e SnRK3 também foram identificados como alterados durante o desenvolvimento do colmo incluindo duas Osmotic Stress-Activated Kinases (OSA-PK) e três CBL-interacting Protein Kinases (CIPK). As CBL são subunidades regulatórias similares a calcineurina responsivas a cálcio (Sanders *et al.*, 2002). Já foi demonstrado que as OSA-PKs e CIPKs mediam a resposta à seca, estresse osmótico, salino e frio em resposta a sinais de ABA (ácido abscísico) e cálcio

(Boudsocq and Lauriere, 2005). O gene *CIPK14* de *Arabidopsis thaliana* mostrou-se induzido por sacarose e elementos responsivos a esse dissacarídeo foram identificados em seu promotor (Lee *et al.*, 2005). É possível que o estresse osmótico gerado pela alta concentração de sacarose no colmo sinalize para alterações de expressão gênica em resposta a este estresse, via as CIPKs e OSA-PKs.

Uma proteína quinase dependente de cálcio ou CDPK também foi identificada como regulada durante o desenvolvimento do colmo (Papini-Terzi *et al.*, 2007). Estudos mostram que algumas CDPKs fosforilam e regulam a enzima sacarose sintase (Huber *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999; Hardin *et al.*, 2003; Hardin *et al.*, 2004). É sabido que o controle da síntese de sacarose depende da atividade da enzima sacarose fosfato sintase, que catalisa a síntese de sacarose 6-fosfato a partir de UDP-glicose e frutose 6-fosfato. A clivagem, por sua vez, depende da atividade da invertase, que cliva a sacarose em glicose e frutose, e da atividade da enzima sacarose sintase, que converte a sacarose em frutose e UDP-glicose na presença de UDP (Moore, 1995) (Figura 1). A fosforilação da enzima sacarose sintase de milho no resíduo Ser-15 por CDPKs parece estimular a atividade de quebra de sacarose dessa enzima (Huber *et al.*, 1996; Hardin *et al.*, 2003). Além disso, CDPKs são capazes de fosforilar o resíduo Ser-170 dessa enzima e direcioná-la para degradação pela via dependente do proteossomo 26S (Hardin *et al.*, 2003; Hardin *et al.*, 2004) e de inativar a enzima sacarose-fosfato sintase (McMichael *et al.*, 1995; Pagnussat *et al.*, 2002). A sacarose sintase está relacionada a diversos processos fisiológicos, incluindo relações entre órgãos fonte e dreno, importantes para o acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar (Zrenner *et al.*, 1995; Hanggi *et al.*, 2001). Como a biossíntese de sacarose parece ser um processo regulado por cálcio, as CDPKs e CIPKs de cana-de-açúcar

diferencialmente expressas durante o desenvolvimento do colmo podem representar pontos críticos no controle do acúmulo de sacarose nessa gramínea. Uma *CDPK* também se mostrou diferencialmente expressa em folhas das progênes contrastantes para Brix, o que pode sugerir que ela participe do controle de abertura dos estômatos em folha (Li *et al.*, 1998; Assmann *et al.*, 1999).

Uma vez que a regulação da expressão gênica tem grande importância para o processo de acúmulo de sacarose, o conhecimento de promotores específicos de cana trará recursos essenciais tanto para o entendimento desse mecanismo como para os esforços na geração de linhagens transgênicas. Como principal fonte de recursos para o processo de identificação de regiões promotoras ativas nos diferentes tecidos da cana-de-açúcar há o catálogo de transdução de sinal e genes regulatórios de cana denominado SUCAST (*Sugarcane Signal Transduction Catalogue*) Database, que integra genes, categorizações filogenéticas do quinoma da cana, matriz de expressão, dados de seqüência e domínios (Souza *et al.*, 2001) (<http://sucest-fun.org>).

Atualmente há o interesse na busca de promotores mais adequados à cana-de-açúcar (Liu *et al.*, 2003; Braithwaite *et al.*, 2004), uma vez que a disponibilidade de promotores tecido-específicos é crítica para o desenvolvimento de plantas transgênicas. Embora mantenham um padrão relativamente constante, os promotores constitutivos podem conduzir a modelos de expressão distintos quando introduzidos em diferentes espécies, tipos celulares ou condições de cultivo, não havendo garantia de expressão no tecido desejado (Neuteboom *et al.*, 2002; Benfey *et al.*, 1989), podendo acarretar problemas fenotípicos tais como nanismo e deficiência no desenvolvimento e crescimento (Liu *et al.*, 1998). O silenciamento, muitas vezes presente em plantas geneticamente modificadas, é igualmente um dos

grandes entraves na utilização de promotores constitutivos, como o *CaMV35S* (Lakshmanan *et al.*, 2005).

Figura 1. Via de produção de UDP-glicose, frutose e glicose em plantas. SPS: sacarose fosfato sintase; SPP: sacarose fosfato fosfatase; SUS: sacarose sintase; e Invertase: invertase. Vale ressaltar que a seta de equilíbrio da reação catalisada por SUS está incorreta, favor considerá-la como uma seta de equilíbrio químico.

Além disso, o uso de promotores constitutivos é uma das causas da grande preocupação a respeito dos efeitos dos transgênicos no meio ambiente. Promotores como o *CaMV35S*, por exemplo, quando ligados a genes utilizados para seleção de

transformantes determinam geralmente a expressão do produto gênico em todos os tecidos da planta. Tal característica, desnecessária e indesejável em vegetais geneticamente modificados, tende a diminuir a aceitação desses produtos.

Muitos têm sido os esforços na obtenção de linhagens transgênicas em cana-de-açúcar, muitas das vezes recorrendo a um conjunto limitado de promotores, quase sempre constitutivos e não específicos do organismo de estudo. Por essa razão, surgiu o interesse óbvio da busca de seqüências promotoras mais adequadas aos fins de transgenia, que pudessem por sua natureza intrínseca levar a resultados mais afortunados. Fez-se assim importante a composição de um catálogo de seqüências promotoras específicas de cana-de-açúcar, bem como de atividade tecido dirigente e com atividades mais compatíveis àquelas tidas em natureza; promotores constitutivos deixam a desejar quanto à regulação fina, muitas vezes essencial na atividade dos mais variados genes, o que promove na maioria dos casos fenótipos não desejáveis.

As seqüências promotoras de interesse por sua vez podem ser obtidas por várias metodologias, dentre as quais, duas chamam a atenção e vêm sendo amplamente utilizadas em cana-de-açúcar: *genome walking* e varredura de biblioteca de BACs com sondas marcadas radioisotopicamente. *Genome walking* tem ganhado força como uma técnica de amplificação e obtenção de fragmentos de seqüência à montante de genes de interesse, desde que os *primers*, necessários ao processo sejam devidamente planejados, ponto-chave nessa técnica, valendo lembrar a alta complexidade genômica em cana, bem como a ausência de seu genoma sequenciado. A varredura de BACs por sua vez permite a obtenção de grupos de BACs enriquecidos dentro dos quais as seqüências de interesse devam estar inseridas, mas problemas de inespecificidade de sonda e dificuldades na

exclusão de falsos positivos mostram-se como os maiores entraves da técnica. No caso de cana-de-açúcar, os ensaios de varredura são realizados utilizando-se um jogo de seis membranas (A, B, C, D, E e F) para o cultivar R570 de cana-de-açúcar, com cobertura genômica de 1,5x, gerada por um grupo de pesquisa da Clemson University, USA (Tomkins *et al.*, 1999). Por se tratar de uma gramínea de alta poliploidia e aneuploidia ($2n=100-130$), a variação alélica das seqüências promotoras deve ser considerada e muito provavelmente passível de ser identificada em cana-de-açúcar, desde que todo o conjunto de clones seja varrido. De maneira a potencializar a técnica de varredura de BACs esforços recentes foram realizados, se utilizando de sondas contendo todos os quatro nucleotídios marcados por radioisótopo, ao contrário do usual, no qual apenas um é marcado, e parâmetros como tempo de hibridação, revelação e exposição das membranas às sondas foram otimizados. A essa técnica deu-se o nome de *overgo* (Madishetty *et al.*, 2006) e resultados promissores têm sido obtidos, ampliando ainda mais o banco de BACs identificados com regiões gênicas em cana.

O transcriptoma de variedades segregantes para teor de sacarose foi acessado via uma nova plataforma, customizada de oligos *Agilent*, a qual se mostrou uma ferramenta importante na varredura por possíveis candidatos a genes interessantes para os processos relacionados ao acúmulo de sacarose. Várias são as vantagens de tal plataforma, muito em função de sua mais alta eficiência, quando comparada a chips anteriormente utilizados, confiabilidade e quantidade de genes depositados em sua lâmina. Os genes de interesse são selecionados de acordo com seu padrão diferencial de expressão, bem como sua importância em vias relevantes para o acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar, envolvendo desde vias de biossíntese de hormônios (etileno, ácido jasmônico), vias de transdução de sinal

envolvendo fatores de transcrição que se destacam dentro do escopo do estudo (como aqueles responsivos a auxina e diretamente relacionados à ativação de transcritos ABA relacionados), processos de expansão celular, cascatas de sinalização envolvendo famílias de proteínas quinase como as SnRKs e fosfatases, como a PP2C, ou ainda vias envolvendo a biossíntese de trealose, muito em evidência em processos associados a estresse e sinalização por açúcares em modelos recentes para plantas.

A integração dos dados de expressão nos permite acessar parcialmente essa complexa rede de regulação que confere indivíduos diferenciados do ponto de vista do acúmulo de sacarose (genótipos de mais alto Brix, provenientes dos cruzamentos utilizados no presente estudo) e visualizar vias que possam ser utilizadas para suplantar antes valores limítrofes para o teor de sacarose. É evidente que, apesar de poderosa, a varredura em larga escala por genes de interesse por meio das análises de transcriptoma por si só não é capaz de sedimentar redes regulatórias, em parte ou totalmente, mas não deixa de ser uma etapa importantíssima e rica neste processo, pela robustez de seus resultados, tanto do ponto de vista experimental, com taxas de validação por RT-PCR relativamente altas, bem como pela qualidade das análises de bioinformática empregadas para a determinação do grupo de genes considerados diferencialmente expressos para o contraste adotado, no caso segregação para teor de sacarose.

2. OBJETIVOS

2.1. Clonagem de promotores de cana-de-açúcar

Para clonar promotores de genes selecionados a partir dos dados de expressão será utilizada a técnica de *Genome Walking* (Clontech®). Apenas proteínas quinase que sejam enriquecidas em tecidos específicos e associadas ao acúmulo de sacarose serão utilizadas na busca das seqüências de interesse. Essa estratégia enquadra-se em um objetivo maior e a longo prazo: obter alternativas de promotores para a expressão de genes de interesse biotecnológico em cana-de-açúcar para a geração de plantas transgênicas.

2.2. Avaliação do transcriptoma associado ao Brix em cana-de-açúcar

Para a identificação de genes codificantes para quinases e outros genes diferencialmente expressos e associados ao Brix, pretende-se realizar hibridações, conduzidas utilizando chips de oligonucleotídeos *Agilent* customizados, contendo 44 mil elementos. Os dados de expressão serão analisados utilizando metodologias desenvolvidas pelo grupo.

O objetivo principal desse estudo é tentar compreender como a expressão gênica se comporta quando genótipos de alto Brix são comparados com genótipos de baixo Brix. A partir desses resultados será possível avaliar, através da técnica de microarranjo, a existência de algum tipo de padrão de ativação ou desativação de vias metabólicas específicas que poderão por sua vez ser utilizadas na busca de

marcadores moleculares e para a obtenção de plantas transgênicas. Isso permitirá que no futuro possa se obter um aumento na produtividade de cana-de-açúcar tanto pelo aumento da sua biomassa total em campo quanto pelo aumento do teor de sacarose na planta.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção de genótipos contrastantes para o teor de sacarose (°Brix)

Na tentativa de identificar genes associados ao conteúdo de sacarose em cana-de-açúcar, experimentos foram realizados com cinco populações diferentes do programa de melhoramento da Ridesa cultivadas em campo no CCA-UFSCar, sob a tutela da prof(a) Dr(a) Monalisa Sampaio Carneiro, pertencente ao Departamento de Biotecnologia Vegetal do CCA-UFSCar: a) 4 séries de progênes F1 cultivadas desde 2005 (fase T1) como resultado de cruzamentos entre progenitores contrastantes em relação ao teor de sólidos solúveis (Brix) (Cruzamento I: SP83-2847 x TUC71-7; Cruzamento II: SP70-1143 x RB925211; Cruzamento III: SP80-3280 x RB855156 e Cruzamento IV: RB855002 x RB855035) e b) uma progênie T3 derivada de dois ciclos de seleção que teve como objetivo aumentar a concentração de alelos favoráveis para o enriquecimento de Brix. Todas as quatro progênes F1 foram compostas de 150 genótipos, enquanto a população T3 contava com apenas 20 genótipos. As características agro-industriais dos oito progenitores (C) utilizados para obter as progênes F1 são: SP83-2847 (genótipo rico em sacarose, com Brix 23-24, precoce e média exigência para a fertilidade do solo), TUC71-7 (genótipo com baixa sacarose com Brix 19-20, tardio, de adaptação frágil ao ambiente, apresentando resposta intermediária a carvão e não tolerante à seca), SP70-1143 (genótipo rico em sacarose com Brix 23 -24, precoce, pouco exigente para fertilidade do solo e resistente às principais doenças); RB925211 (genótipo baixo em sacarose com Brix 19-20, tardio, pouco exigente para fertilidade do solo e suscetível à ferrugem), SP80-3280 (genótipo de baixo Brix, 20-21, tardio, com alta

produção agrícola e exigente para fertilidade do solo), RB855156 (genótipo rico em sacarose, Brix 24-25, muito precoce e pouco exigente quanto à fertilidade do solo), RB855002 (genótipo de baixo Brix, 19-20, resistente às principais doenças e exigente quanto à fertilidade do solo); RB855035 (genótipo rico em sacarose, com Brix 22-23, precoce, pouco exigente para fertilidade do solo e suscetível à ferrugem).

3.2. Conteúdo de sólidos solúveis (Brix)

O conteúdo de sólidos solúveis (Brix) foi obtido através da leitura do suco extraído com perfurador manual (Papini-Terzi *et al.*, 2009) na porção central do entrenó 13 de quatro réplicas biológicas por genótipo (i.e., quatro colmos fenotipicamente similares e de uma mesma touceira). Algumas gotas de suco foram colocadas em um refratômetro portátil (N1, Atago, Japão) e a medida direta obtida. A amostragem de tecidos nas populações F1 foi feita a partir dos genótipos mais contrastantes para Brix: 10 genótipos com maior Brix e 10 genótipos com menor Brix foram selecionados de cada população. Na progênie T3, dois grupos de cinco genótipos, com valores contrastantes de Brix, foram escolhidos. As medidas de Brix em campo foram realizadas com todos os genótipos disponíveis de todos os cruzamentos de plantas com 7, 9 e 11 meses de idade.

3.3. Clonagem de promotores por *Genome Walking*

Amplificação da região 5' - Para obter regiões com atividade promotora foi utilizado o kit *Universal GenomeWalker* (Clontech, USA). Primeiramente, o DNA genômico de cana-de-açúcar foi digerido com quatro endonucleases de restrição

(*DraI*, *EcoRV*, *StuI* e *PvuII*), que deixam as extremidades abruptas. Os produtos das digestões foram então purificados e ligados a adaptadores providos no kit, criando-se quatro bibliotecas *GenomeWalker*. Para obter a região 5' dos genes de interesse, foram sintetizados dois oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene (GSP – *gene specific primer*; GSP1 e GSP2) que anelam na região 5' da sequência codificadora do gene, conforme recomendado pelo fabricante (26-30mers; GC% 40-60%; $T_m > 67^\circ\text{C}$). Para cada biblioteca e para cada gene, foram realizadas duas reações de PCR consecutivas. Na primeira PCR foi utilizado um iniciador fornecido pelo kit (AP1: *adaptor primer*, 10 μM) e um iniciador específico do gene de interesse (GSP1, *gene-specific primer 1*, 10 μM). A reação obedeceu a uma rotina de sete ciclos iniciais de 94°C por 2s, para desnaturação, 72°C por 3min, para anelamento e extensão, seguido por 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 2s e anelamento e extensão a 67°C por 3min. Após os ciclos, a reação foi submetida a um período adicional de polimerização de 4min a 67°C. Posteriormente, os produtos desta reação foram resolvidos em gel de agarose 2,0% (p/v) para verificar a eficiência da reação. Juntamente com as quatro reações provenientes das bibliotecas genômicas, foram também conduzidas duas reações controle, uma contendo água em substituição ao DNA genômico digerido e outra contendo DNA genômico e oligonucleotídeos específicos proveniente do kit, para compor respectivamente os controles negativo e positivo.

O produto da primeira reação de PCR para cada biblioteca e dos controles foi diluído 50 vezes e então utilizado para a segunda PCR. A reação conteve 1 μL do produto diluído da primeira PCR, um iniciador *nested* também fornecido pelo kit (AP2 *nested*) a 0,2 μM e um iniciador *nested* específico do gene (GSP2 *nested*) também a 0,2 μM . Para a reação do controle positivo foram utilizados oligonucleotídeos

específicos provenientes do kit. A reação seguiu um programa de 5 ciclos de desnaturação a 94°C por 2s, anelamento e extensão a 72°C por 3min, seguidos por 20 ciclos de desnaturação a 94°C por 2s e anelamento e extensão a 67°C por 3min, finalizada por incubação a 67°C por 4min. Os produtos desta segunda PCR foram então resolvidos em eletroforese em gel de agarose 2% (p/v). Os fragmentos desejados foram purificados utilizando o *kit Perfect Gel Cleanup* (Eppendorf) conforme recomendações do fabricante. Os fragmentos purificados foram ligados no vetor pCR2.1 (Invitrogen), utilizando o *TA Cloning® Kit* (Invitrogen) conforme instruções do fabricante seguindo-se transformação de células competentes de *E. coli* DH5 α . Após a transformação, as bactérias foram selecionadas em placas de Petri contendo LBC solidificado com X-Gal (LB contendo 1,5% (p/v) agar, 50 μ g/mL de carbenicilina e 1,2mg de X-Gal). As colônias brancas positivas para a presença do inserto foram isoladas, subcultivadas e utilizadas como molde em uma PCR utilizando os iniciadores T7 e M13 a fim de confirmar a presença do inserto.

Os clones positivos foram submetidos à extração do DNA plasmidial para seu posterior seqüenciamento. A minipreparação de plasmídeos foi feita utilizando-se o *Fast Plasmid Mini kit* (Eppendorf) de acordo com as instruções do fabricante. O seqüenciamento dos insertos foi realizado com o *kit Big Dye Terminator 3.1* (Applied Biosystems) e o sequenciador automático ABI 3100, de acordo com as instruções do fabricante.

3.4. Condução dos experimentos para avaliação do transcriptoma associado ao Brix

O trabalho foi desenvolvido na Estação Experimental do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar (EEPMGCA), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, no ano de 2008.

Foram utilizadas quatro progênies F_1 , sendo cada uma composta por 150 indivíduos. Foi utilizada também uma progênie T_3 ou cruzamento V composta por 20 genótipos. As avaliações de Brix foram realizadas em canas-de-açúcar com idades de 7, 9 e 11 meses após o plantio. O teor de sólidos solúveis totais, i.e. Brix, foi obtido através da leitura do caldo extraído com perfurador manual, no terço médio de dois colmos, a partir de duas canas por touceira. Algumas gotas do suco foram colocadas em um refratômetro portátil (N1, ATAGO, Japan) e a medida direta obtida. Em cada época de avaliação foram coletadas amostras de folha+1 e entrenó1. A partir dos dados obtidos nas avaliações do Brix de cada progênie foram escolhidos os 10 genótipos com menores e maiores valores de Brix e a partir destes materiais foram preparados *pools* de mais alto brix e mais baixo brix, combinando massas iguais de entrenó de cada um dos genótipos do dado grupo e foram estes *pools* que foram hibridados no chip *Agilent*.

3.5. Coleta de amostras para Biologia Molecular

Dos experimentos de Brix conduzidos em campo foram coletadas amostras para extração de RNA total. Amostras de folha+1 e entrenó1 foram picadas dentro de tubos Falcon de 50ml imersos em nitrogênio líquido e conservadas a -80°C . A

coleta de folhas+1 foi realizada retirando-se a base e o ápice das folhas e picando-se a porção mediana (aproximadamente 30 a 40cm). Para os entrenós, a casca dos colmos foi retirada, e a região dos entrenós picada e armazenada da mesma forma que para folhas. Entrenós 2 foram eventualmente coletados conjuntamente com os entrenós1 em tubo Falcon de 50 ml (nos casos em que o entrenó1 era muito pequeno).

3.6. Extração de RNA e tratamento com DNase

O RNA total dos cultivares selecionados para estudo foi extraído com o método TRIZOL® (Life Technologies) otimizado visando aumento do rendimento, haja vista a pequena massa do entrenó1 e sua alta susceptibilidade à degradação por oxidação.

Todo o material (almofariz, pistilo, pinças, espátulas etc) foi lavado extensivamente com água corrente e sabão e então enxaguado com água destilada em abundância. Os materiais foram limpos com álcool 70% (preparado com água milliQ) e então enxaguados com água tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato) e secos em estufa. Ademais, todo e qualquer material que entrou em contato com os tecidos de folha+1 e entrenó1 foi previamente congelado em $N_{2(l)}$ e no caso do almofariz, este foi mantido então sobre uma camada pulverizada de gelo seco.

As amostras de entrenó1 e folha+1 foram trituradas no almofariz com pistilo até virar um pó bastante fino, com constante adição de $N_{2(l)}$. Cada alíquota de aproximadamente 100mg foi homogeneizada em 1ml de TRIZOL gelado. As amostras foram então incubadas em vortex (intensidade média) por 5 minutos a

temperatura ambiente para a completa dissociação dos complexos núcleo-proteicos. A seguir, 200µl de clorofórmio foram adicionados a cada uma das amostras e então agitadas vigorosamente com a mão por 30 segundos, seguido de incubação a temperatura ambiente por 3 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12000rpm por 15 minutos a uma temperatura de 4°C e somente a fase aquosa (fase superior da extração orgânica) foi colhida e a esta 500µl de álcool isopropílico foram adicionados, seguido de inversão dos tubos por 30x e incubação a temperatura ambiente por 20 minutos. O RNA precipitado foi então depositado por centrifugação a 12000rpm por 10 minutos a 4°C; a lavagem do precipitado formado foi feita uma só vez (para evitar perdas excessivas de material) com 1ml de álcool 75% preparado com água previamente tratada com DEPC e novamente depositado a 9000rpm por 5 minutos a 4°C. O álcool foi retirado e o precipitado deixado para secar na capela a temperatura ambiente por aproximadamente 25 minutos.

A dissolução dos precipitados de RNA foi feita com 20µl de água milliQ livre de RNase e ressuspensão por pipetamento. Os tubos foram então incubados a 60°C por 10 minutos para uma dissolução mais eficiente e então a solução foi novamente homogeneizada por pipetamento. A integridade das amostras foi averiguada por eletroforese em gel de agarose 1,5% específico para RNA.

O tratamento de todas as alíquotas de RNA extraídas foi feito utilizando *Dnase Amplification Grade* (Invitrogen) de acordo com as indicações do fabricante, com volume final de 100µl e a eficiência do tratamento foi verificada por PCR quantitativo, visando determinar eventuais traços de DNA.

3.7. Síntese de cDNA

Duas µg de RNA total foram utilizados para a reação de transcrição reversa usando o kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) segundo informações do fabricante. O produto de cDNA obtido foi tratado com 2U de RNase (Invitrogen) por 30 minutos a 37°C, seguidos por 10 minutos a 72°C. O cDNA foi armazenado em -20°C para análises subseqüentes.

3.8. Reações de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um equipamento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os *primers* específicos para os genes selecionados foram desenhados usando-se o *Primer Express 2.0 Software* (Applied Biosystems). As reações de PCR em tempo-real foram realizadas utilizando-se 1µL do cDNA sintetizado diluído 1:10, 5µL do *primer* Forward misturado com o Reverse na concentração de 1,5mM (cada um) e 6µL de *SYBR Green PCR Master Mix*. O ciclo para as reações de PCR em tempo real foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos seguido de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelas curvas de dissociação geradas pelo equipamento. Foram utilizados controles negativos sem adição de cDNA sintetizado para confirmar a ausência de qualquer tipo de contaminante no meio reacional (*No Template Control*, NTC), bem como controles negativos contendo, ao invés de cDNA, o produto da reação de NAC (*No Amplification Control*), diluído 1:10.

Para identificação do normalizador a ser utilizado, foi conduzido um experimento teste com 4 candidatos a normalizador para identificar qual seria o

melhor a ser utilizado (dados não mostrados). Tanto para amostras de folha+1 quanto para entrenó1 decidiu-se a utilização de PUB como gene normalizador. O método de obtenção de normalizadores assim como da obtenção das razões de expressão (experimental/controle) foram determinadas pelo método descrito por Livak and Schmittgen, 2001, no caso $2^{-\Delta Ct}$. Para acessar a significância estatística acerca das razões de expressão gênica nos ensaios de RT-PCR, foi assumido um modelo log-normal e as probabilidades $Pr(HB > LB)$ e $Pr(HB < LB)$ calculadas para os genes induzidos e reprimidos, respectivamente (Rocha et al., 2007).

3.9. Obtenção das sondas, hibridação nos microarranjos de oligonucleotídeos e análise dos dados

O processo utilizou 2000ng de RNA de cada amostra a ser hibridada. Todo o procedimento foi feito de acordo com os protocolos presentes no material do fabricante (*Agilent Technologies*) intitulado *Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Quick Amp Labeling)*. Todos os kits foram providos pelo mesmo fabricante, compondo um pacote responsável por todo o processo desde a preparação das sondas até a análise inicial dos dados.

O processamento das amostras, extração e quantificação do RNA foi feito conforme descrito (Rocha et al., 2007). Foi obtido cRNA marcado com Cy3 e Cy5 a partir de 2µg de RNA que foram por sua vez utilizados como molde para amplificação de RNA poli(A) pela T7-RNA polimerase utilizando o kit *Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification*. Um controle *spike* de mRNA sintetizado *in vitro* (Agilent RNA Spike-In kit) foi utilizado nas reações de amplificação e

marcação com Cy3 e Cy5. As hibridações foram realizadas com duas réplicas biológicas. A hibridação de 2µg de cada cRNA marcado foi feita com o kit de hibridação da Agilent *in situ* Hybridization kit-plus, como recomendado pelo fabricante usando 44 k *oligoarrays*. As lâminas foram então lavadas e processadas de acordo com o protocolo de processamento 60-mer da Agilent e escaneadas utilizando-se um scanner GenePix 4000B scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Os dados das imagens foram extraídos utilizando-se o *software Feature Extraction* 9.5.3 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA) utilizando como referência o *benchmark* para microarranjos de duas cores da Agilent (Kerr, 2007). Os dados da intensidade derivada de Cy3 e Cy5 de uma mesma amostra foram corrigidos e normalizados utilizando-se a função Lowess (Yang et al., 2002) através de uma nova ferramenta implementada no ambiente R do nosso servidor levando-se em consideração os sinais dos *spikes* do mRNA sintético utilizado. Os genes diferencialmente expressos foram definidos utilizando-se o método do HT-self (Vencio and Koide, 2005) como descrito (Papini-Terzi *et al.*, 2005; Papini-Terzi *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2007), modificado e adaptado à nova plataforma e ao software de extração de imagens *Feature Extraction*.

3.10. Técnicas padrões de Biologia Molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular como preparação de plasmídeos, transformação de bactérias, digestão de DNA por enzimas de restrição, extração de RNA, DNA genômico, DNA plasmidial, síntese de cDNA, preparação de géis de DNA e RNA, dentre outros foram conduzidos segundo protocolos fornecidos pelo fabricante ou contidos em Sambrook *et al.*(1989).

4. RESULTADOS

4.1. Varredura *in silico* de seqüências à montante de proteínas quinase de interesse

Uma vez que esforços anteriores puderam gerar um banco de quinases em cana-de-açúcar caracterizadas por filogenia, contendo 456 elementos (Rocha *et al.*, 2007), estes foram alinhados localmente pelo algoritmo *Blast* contra 159 BACs já seqüenciados, montados e devidamente depositados no banco www.sucest-fun.org. Os parâmetros adotados foram os *default* do algoritmo. Apesar de um total de 159 BACs depositados em nosso banco, contendo em média cada um deles 500kb, nada garante que todas as 456 quinases constantes na filogenia utilizada pudessem ser alinhadas, já que nem todo o vasto genoma da cana pode ser coberto por estes 159 BACs, muito menos em números de cobertura suficientemente adequados para este fim. Os resultados mostraram um ligeiro enriquecimento nos BACs de proteínas quinase da família das SnRKs ou *SNF-like kinases* (16 *hits*), seguido de perto pela família das quinases relacionadas a cálcio (11 *hits*), valendo ressaltar que tal enriquecimento é uma consideração que deve ser tomada dentro de apenas este ensaio de alinhamento, uma vez que nem o quinoma completo da cana-de-açúcar, nem um conjunto suficientemente completo de BACs (sempre lembrando de uma cobertura suficiente, sendo quão maior, melhor para fins experimentais) foram utilizados (Tabela I).

Tabela I: Contabilidade dos resultados de alinhamento por *Blast* do quinoma de cana já categorizado (Rocha, 2006) contra um grupo de 159 BACs montados. Das 456 quinases utilizadas como *query*, 56 puderam ser alinhadas com pelo menos um BAC de acordo com os parâmetros utilizados (*parâmetros default*).

<i>Categorias de quinases em cana-de-açúcar</i>	<i>#SAS com pelo menos um hit nos BACs</i>
Calcium-related	11
GSK3/shaggy	2
MAPK/MAPKK/MAPKKK	7
other	1
putative RLCK	2
RLCK	7
SNF-like kinase	16
undefined	10
Total	56

As categorias de proteínas quinase contidas na Tabela I foram geradas a partir do confronto com o banco de quinases à época de *Arabidopsis thaliana* através de análises de domínio e similaridades por *blast* (Rocha *et al.*, 2007), uma vez que nem à época e nem aos dias de hoje há o acesso ao genoma de qualquer que seja a variedade de cana-de-açúcar completamente sequenciado e montado. Esforços vêm sendo executados em vistas ao sequenciamento do genoma de cana-de-açúcar, no caso de uma variedade amplamente utilizada científica e comercialmente, SP80-3280 através da metodologia de *shotgun*.

É sabido que um grande número de genes que codificam para proteínas quinase estão envolvidas no processo de acúmulo de sacarose por intermédio da cascata de sinalização por cálcio, dentre as quais as *SNF-like kinases* parecem ter papel importante (Rocha *et al.*, 2007; Hrabak *et al.*, 2003).

4.2. Clonagem de seqüências de regiões promotoras por *Genome Walking* (GW)

O desenho dos *primers* para esse tipo de PCR teve de levar em consideração alguns pontos em função da complexidade do genoma de cana-de-açúcar. Os trabalhos se iniciaram por um blastp da proteína predita pelo orffinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) no Phytozome (<http://www.phytozome.net/>), um banco de dados que possui o genoma anotado de sorgo (*sorghum bicolor*), modelo mais próximo de cana-de-açúcar, uma vez que o genoma de cana ainda não foi sequenciado. O gene ortólogo em sorgo foi então utilizado para a identificação das prováveis intersecções íntron/éxon, observando-se a devida sintenia. O alinhamento entre a *orf* de cana e a porção íntron/éxon de sorgo foi realizado pelo programa SIM4 (<http://www.bioinformatics.ubc.ca/resources/tools/sim4>), que utiliza um algoritmo otimizado para alinhamentos entre seqüências genômicas e cDNA. Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), segundo as condições do fabricante do kit utilizado para o protocolo de *genome walking*.

Os genes utilizados na busca por promotores foram selecionados de acordo com seu padrão de expressão em diferentes experimentos de hibridação de amostras de alto Brix versus amostras de baixo Brix (Figura 2 e Tabela II). Estudos em cana-de-açúcar parecem apontar a relação de proteínas quinase do tipo G11 com ABA (ácido abscísico) e processos relacionados a seca (Rocha *et al.*, 2007), sendo que tais proteínas ainda não foram exploradas profundamente. REK por sua vez pertence à família das SnRKs (*SNF1 related kinases*), sendo assim um alvo interessante de estudo por ainda haver igualmente poucos dados em cana-de-

açúcar sobre ela. O SAS da família caneMHK mostrou-se modulado em folhas de plantas de alto Brix, e por se tratar de um gene envolvido no ciclo celular, também foi abarcado para estudos. Vale ressaltar, que os esforços despendidos na procura por seqüências promotoras de genes codificantes para quinases fazem parte de uma ação maior de catalogação de prováveis seqüências promotoras para fins de transgenia em cana-de-açúcar e, portanto, a diversificação na escolha de alvos também tem seu valor, uma vez que além das diferenças em virtude da própria natureza do gene correspondente, há também a especificidade de tecido (SASGMS11561 e SASGMS16343 se mostraram modulados em folha+1; e SASGMS09047 em entrenó1).

Para cada uma das quatro bibliotecas utilizadas como *template* foi obtido um padrão multi-bandas, muito provavelmente em função do alto número de alelos presentes no genoma de cana, podendo se considerar no mínimo decaploidia (Figura 3).

>(SCCCLB1003E11.g) SASGMS09047

```

1 gagcagctaa acagcgtatg gtacatcttt atttactcac ttatatattat gtattgtcac
61 tgcattgctaa gttgatccgt acaaggcaat ctgcaattgt acagcgtat acaaacttat
121 tatacagagt ggaatgcaac atcccttata acagcagcg gttaggctcg gcggcgccat
181 atctgcagca caaaggactc gacgccatga gtgagcagct gctgagctgc ctgcaggagc
241 gatcagtagg tgtcatcagc gtctgcctct tcgtcgctgc tctccagctc tgctatctcg
301 gccagcagcg ccgggtcgac caccttgac atgtcaccgg ggtctctggc ctctgaacg
361 atccgcatga tctcgccac gccctgcgcc ggctcggcg catccgcgtc cttgtagtgt
421 gccttctccc tctccgagat ctccctcggc aggttcttca ggaaccacgg gtgatgcttt
481 atctccggga tcgtgatcct cttgaagga tcggcaacga atatttgaga cagaaggcgt
541 ctgcagctctg aagacactct cacataatcc gggatggagt attgcacgcc aagaattcta
601 ctgatcggtt tccggaagt ccttgatcc tcaggatctt caaatggata cgatcccacg
661 agcatcacgt acagtgtgac accacaggac caaacgtctg ctacctttcc atcactactc
721 tttctggaaa gaacctcggg cgctatgtat gctggagtcc caactgttga ttttggtttg
781 gaatgcagca aaccagactt tgagtaacca aagtcacaaa ttttcacgag aggtgttgga
841 ctcccatcaa ggagggtatt ctcaagtta agatcacggt gacaaatttc cacagagtga
901 cagtagctga ctctgatata cagctgctga aagaaatacc tggactcatc ttcactgaat
961 cgccctgctg tgggtgattt ctcaaatagc tctccaccag cagcatattc catgacgata
1021 gcaagatgtg tgggtgttaa acaaacctcc ttgaaccgta cgatgttagg gtgccggagc
1081 gactggatgat tgatgatctc cctctgcaca ttctcatcga tcttcttgcc cctctcgatg
1141 tacttgacgg cgacgagctc cttggtccgc ttgtccctga ccagcctcgc caccgcgaag
1201 ttgccggccc ccagctcctt tagcgccctg tacctctcct ccatacagcag ttcagcagcg
1261 gtcccgacct agaactccca agaatggcga gttggcgaca ccgaagaaaa g

```

>(SCCART2002G11.g) SASGMS11561

```

1  ggcggaacaa gcaagattt atatttagaa ctgtgttttag ccgagcatgt cacactccat
61  acaaaccac cgaacaagca aaaaatccat gcagtaacaa gtaacaactg aaaccagtca
121 cacttcgcaa agcataaaac acaatgtcac atggagacac attcggccat gctcgcgaacc
181 aacgccttg gaccagggga ccagggaag atcaggtgca cgaaccggga cgctcttat
241 tctcgtcacg cacaagcaca gtaacagaca atgctgagca acatccactg ctgcaaagga
301 gattggtggt ttattctgag gtaagtagcc ggggaagagt agcggtgaca ctctgggagg
361 gcaaccattg aatctgtttc ttggagcttc agcttcagct tacgagcttc ctgggaagga
421 gagccctatc gcctggcatc tcatatgagc gccggaagg gtcgggctggg ccatgccacg
481 ccctggatcc cacgggcaag gggcgcttga cagtgttccc atgggttcga tacttcaggt
541 ctgtagcgaa cctctcggaa cccaaactg aaaccctgtt ggggccatt gacagctgag
601 acagcttctc ttcaaggtca ggtgcacgg ggttctgac ctgggcaagg taattcccat
661 tgctccttac tgctgctggt ctggaccaag actgattcat cacgttcgcc ttgtcacct
721 tatggttagt cctctgggagc tgggatcca actccaattt cctttgcaca ccagctgctc
781 ttgctggagt gttattgctc aagtatgagt aattaactgt tggcctcgca ttgggtacag
841 tccccatgag gtatctccta atgttcttct gatccacagc tcttttagc ccagctgag
901 gtggcggttg tgcatatccg gtggatttga agcgaagtga aggagggaca tagaagcacg
961 tctgaaagaa gggatgctgc aaaacctcca ctgctgttgg ccttctcgt ggggtccatg
1021 agcaaagcca cgaaataagg ctgattgcat ctctcgcttg taagggaacc acttccgaaa
1081 gatgtacgct ttcaactga ggaactgaa aacctataga tgctgctagc tgcagtcctt
1141 caggccaagt gcgctgattc ggagtgcga gaatgctaca gattttgtag agttcatctg
1201 gttcacttga gccaggaaaa agtggtcgca gcgaaaaaag ctccagcgata atggcaccca
1261 ttgcccacat gtcaactgct gcattgtaaa cagtagcctg tagaagaact tcaggggcac
1321 gataccaacg agtggacaca tattccgtat acggtggtc agaagaatt tcacgagcaa
1381 gccaaaaatc cgctatcttg atgagctcct ttgtaacaag caaattttca ggcttaagg
1441 cacggtgaaa atatccacgc tgatgcatgt gactcagagc ttgaaatatt tgaaagcacc
1501 agtttcggat ttcagttctc gagaagggtc tccctctgct ctccatcagt tgataaagac
1561 tacattccat gtactcaaaa acaaagaaca acgtatcatt ctctcttatg acttctttga
1621 gcttcacaat gtttgatgg ttcatccttc gcagggactt cacttcgcgg aggtttatgc
1681 actcttccca agaataatat tttttcttca tcttcttgat cgcaaccact ccaccacttt
1741 ccttattggt tgcacgcca aactcccaa atgttccatc accaacttcc ttgatgatcg
1801 tatacctctc cattttatta gctggtggtg cgcagaactg cccttatttc agaacagttg
1861 tataagtaaca aacaagactc atatatgtat cacaggagcg tctttggatg ttacaacacc
1921 aaagtcaact gagactcctc tcaaagctat gtatgctatt cccatgcttt gcgcaacaaa
1981 atcttgaaca cctctgctct gatgtcatgc catccaaagt gaaggctggt gaaaggtagc
2041 gtaaccaata cacaccgaac ttgggactga ccagaatgaa aacttacagc ggtagggtag
2101 aagaaagcta gcagagaaca aaaaccagaa cctagagctt atatgtgacg gcaaagctct
2161 aagcgtaga ttcaagtgtc cagagatgtc ttgatggtaa cttttgccgg ccaattagca
2221 ccaagacaaa gattaccgaa atgttgccag aaaaacagat ccaccatgct caaataagtg
2281 tgctacagct gcaactgtaat cactaggcaa ctctaattgtc tgacagcatg ggaccaggca
2341 aggcagttgc taagcgcggtg gtgactctca ggtgcagttg acaaaagaga tgaccaagaa
2401 gtctccgtaa agacaaaatc tccagccaag aacttcctcg agcagcgaga tgtgggatac
2461 agaggaaact gcagcgtagg ggggtgactc catatccttg ctgaaaatgc tataactcca
2521 gcagagcacg gtgatgaaac ctgggagcct ctgggcatac ccgcgcgcca ccgcgcgcg
2581 cgccgaaggg tccgggggac ttctgcaccg ccgcctccag cgctgatggg gtgggggagg
2641 aacgggtggg tgggtcaaca ccgcgcgcg cgcggtgtgg aagaggagga ggaggacgac
2701 gacgacgag tgggggaaca cggattggag aggtgggttg cttcgaggat ttttctg

```

>(SCEQRT1024B02.g) SASGMS16343

```

1  cggacgcgtg ggcggacgcg tgggttttgg tctcgtgttt cattttgccc tteccattcc
61 tctccactgc ggtgccacca cctcggggcc ggccccgtgg ggaaccagaa ccacctcttc
121 accggcgccg gcgagggcga acggcgaccg cgacctcccc cgaggccgca cctactagga
181 ttggatttta gctccccggg tctggatttg ttggttgccc gcggcaatgg gaggagggcc
241 gtggtggtgt ccatagggaa tctcgggtcg cgtccttggt gcgatggctt cgacctctgt
301 tcctaagtta gtcgcggaca agaaatgcga taaagccatt gcggatacca ccgcaccatt
361 gacttctcag ggacactctg aagaaccgac tgggaaagtc agcaaactgg tgccttcttt
421 gccgattgta attgcaactg gtgatggggc tgcattccagt ggggtgaaag aaaacaacaa
481 tgacatgagc agttctgctg atggttctgt gaagctggat gacagtgaag atgctgagaa
541 gagctcgctg cgggggagtg ttaaggatag ctcggtgtcc gctaaatgca gtgacagggc
601 cagcagcctg tcgaaagcca gcgttagtgc caagggttagt ggtcaacctg ctgacatgat
661 cgagagtggc aagagtagcc tctatcgggc cagtgggtggc agtgatgtga gcgatgagag
721 cacctgcagt agcatttgca gcagcgtcag caagcctcac aagtcaaatg actcaaagtg
781 ggaagcgatt caggcgggtc gaacgaaaga aggtcccgtg ggtctaggtc aattcaggct
841 actcaagagg cttggctgtg gtgatatagg cagtgtatac ttatcagaac ttagtggcac
901 taaatgctac tttgccatga agatcatgga caaggcatca ctagcaagcc gcaaaaagct
961 gcttagagcg cagactgaaa aggagatatt gcagtgcctg gatcatcctt ttcttccaac
1021 attgtacact cactttgaga cagataagtt ctcatgcttg gtgatggagt tctgcctgg
1081 aggtgacctc cataccctaa ggcaaaagca gcctggcaag tatttccctg aacaagctgc
1141 caagttttat gtagcagagg tgcttcttgc tctggaatac ctgcacatgc ttggtatcat
1201 ataccgtgac ttaaagccag agaatgttct tgtgagagaa gatggccata tcatgctgtc
1261 ggatttcgat ttatccctcc gatgtgctgt gagccctact cttctcagat cttctgacct
1321 cagtggggat agccaaaagg gcaacccagc ttactgtgtg cagcctgtgt gcattgagcc
1381 tgctgtatc cagccttctt gtgtcacgac aaccacatgc ttctctcttc gctttttctc
1441 ttccaaatcc aagaaggaga aaaaaagaca aaa

```

Figura 2: Sequência nucleotídica das seqüências consenso dos ESTs (i.e., *expressed sequence tags*) referentes aos genes utilizados no protocolo de *genome walking*, com o objetivo de obter seqüências à montante do primeiro éxon predito pela metodologia utilizada.

Tabela II: *High* representa induzido, *Low* representa reprimido, sendo que a razão de expressão tem sempre baixo Brix como referencial. As razões de expressão utilizadas são a média das duas réplicas biológicas utilizadas nas hibridações.

id	category	Sub category 1	Sub category 2	High	Low
SASGMS09047	Protein kinase	SNF-like kinase	caneREK	3,30364	
SASGMS11561	Protein kinase	Cell cycle-related	caneMHK	3,57013	
SASGMS16343	Protein kinase	Other	caneG11A kinase	4,41746	

A banda de maior peso molecular de cada um dos três genes analisados foi purificada e teve sua seqüência elucidada e alinhada localmente com o genoma de sorgo depositado no banco *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/>) (Figuras 4 e 5). No caso dos fragmentos para SASGMS09047 (*caneREK*) e SASGMS11561 (*caneMHK*), ambos alinham localmente na região a montante do primeiro éxon do respectivo gene ortólogo anotado em sorgo, como era de se esperar (Figuras 4 e 5).

Apenas no caso do gene SASGMS16343, o alinhamento do fragmento obtido contra o genoma de sorgo não obteve sucesso, podendo indicar se tratar de uma sequência correspondente a um gene presente em cana, mas não em sorgo ou mesmo se tratar de um alelo presente apenas no genoma de cana-de-açúcar.

Figura 3. Fragmentos obtidos a partir de PCR *nested* a montante do início do gene em estudo. A, B, C e D são as quatro bibliotecas geradas a partir da digestão de gDNA de cana com as respectivas enzimas *DraI*, *EcoRV*, *StuI* e *PvuII*. O marcador de peso molecular utilizado foi o 1kb *ladder plus* (Invitrogen).

Nos casos em que houve o alinhamento contra o genoma de sorgo, foi possível observar que os fragmentos seqüenciados até então se encontram a montante do primeiro éxon predito em cana e em sorgo, mostrando sintenia, como era de se esperar (Figura 4 e 5). Em ambos os casos a sequência codificante já acrescida do trecho elucidado pelo protocolo de *genome walking* foi alinhada localmente com o banco de *contigs* oriundos dos mais recentes esforços de seqüenciamento do genoma de cana-de-açúcar por meio da técnica de *shotgun* (Figura 6). Tais alinhamentos resultaram na elucidação de regiões mais a montante do primeiro éxon de cada uma das proteínas quinase, objetos do presente trabalho. No caso do gene

SASGMS11561 (*caneMHK*), entretanto, mesmo valendo-se de toda a região do *contig* a montante do primeiro éxon, não foi possível suplantar a região 5'UTR, baseado na sintenia com seu ortólogo em sorgo e pelos algoritmos de previsão *in silico* do programa SIM4, utilizado nas análises comparativas entre cana e sorgo (Figura 4). No caso do gene SASGMS09047 (*caneREK*) foi possível avançar um pouco mais a montante do primeiro éxon (Figura 5).

Figura 4. Alinhamento do fragmento do gene SASGMS11561 (2002G11) (*caneMHK*) contra o genoma de sorgo (<http://www.phytozome.net/>). Em ciano o gene SASGMS11561 (2002G11) e seu fragmento correspondente, a montante do primeiro éxon. As cores cinza (região 5'UTR) e amarelo (éxons) compõem o respectivo gene ortólogo em sorgo. Foi obtido 95.1% de identidade entre o fragmento genômico clonado e a respectiva região em sorgo.

Figura 5. Alinhamento do fragmento do gene SASGMS09047 (1003E11) (*caneREK*) contra o genoma de sorgo (<http://www.phytozome.net/>). Em ciano o gene SASGMS0947 (1003E11) e seu fragmento correspondente, a montante do primeiro éxon. As cores cinza (região 5'UTR) e amarelo (éxons) compõem o respectivo gene ortólogo em sorgo. Foi obtido 87.3% de identidade entre o fragmento genômico clonado e a respectiva região em sorgo.

(SCCCLB1003E11.g) SASGMS09047

Query= (SCCCLB1003E11.g) SASGMS09047 (385 letters)

>contig01610 length=6392 numreads=175
Length = 6392

Score = 605 bits (305), Expect = e-171
Identities = 367/382 (96%), Gaps = 7/382 (1%)
Strand = Plus / Minus

```

Query: 4      tccaagtccaacagacacaaaaanccccgccccggttcgtcacttagtcgcttttcccgac 63
            |||
Sbjct: 5727 tccaagtccaacagacacaaaaa-ccccgccccggttcgtcacttagtcgcttttcccgac 5670

Query: 64      cagccgcgactgccgacggactgcgaccgagagaattgtctatnccggtcacgtctggtt 123
            |||
Sbjct: 5669 cagccgcgactgccgacggactgcgaccgagagaattgtctatnccggtcacgtctggtt 5611

Query: 124     tggtagagttcgctcacacttgtgattgggtatttgggttggtcgcttggtcttctnctc 183
            |||
Sbjct: 5610 tggtagagttcgctcgacttgtgattgggtatttgggttggtcgcttggtcttctnctc 5552

Query: 184     tgctgggagattccttttcttncggtgtcgccaactcgccattcttgggaggtctaggtc 243
            |||
Sbjct: 5551 tgctgggagattcctttt---gcggtgtcgccaactcgccattcttgggaggtctaggtc 5495

Query: 244     gggaccgctgctgagtgtgatggaggagaggtacgagcgctaaaggagctgggggccc 303
            |||
Sbjct: 5494 gggaccgctgctgagtgtgatggaagagaggtacgagcgctgaaggagctgggggccc 5435

Query: 304     gcaacttcggggtggcgagggttggtcagggacaagcggaccaaggagctcgctcgccgtca 363
            |||
Sbjct: 5434 gcaacttcggggtggcgagggttggtcagggacaagcggaccaaggagctcgctcgccgtca 5375

Query: 364     agtacatcgagaggggcaagaa 385
            |||
Sbjct: 5374 agtacatcgagaggggcaagaa 5353

```

(SCCCRT2002G11.g) SASGMS11561

Color Key for Alignment Scores

Query= (SCCCRT2002G11.g) SASGMS11561 (389 letters)

>contig01568 length=6431 numreads=203
Length = 6431

Score = 763 bits (385), Expect = 0.0
Identities = 388/389 (99%)
Strand = Plus / Minus

```

Query: 1      attagaaaatgtagttttactttaactaatacctaatccattatgtgctaatttcagagca 60
            |||
Sbjct: 4869 attagaaaatgtagttttactttaactaatacctaatccattatgtgctaatttcagagca 4810

Query: 61      gaggtgttcaagattttgttgcgcaaagcatgggaatagcatacatagctttgagaggag 120
            |||
Sbjct: 4809 gaggtgttcaagattttgttgcgcaaagcatgggaatagcatacatagctttgagaggag 4750

Query: 121     tctccagtgcacttcggtgttgtaacatccaaagacgctcctgtgatacatatatgagtct 180
            |||
Sbjct: 4749 tctccagtgcacttcggtgttgtaacatccaaagacgctcctgtgatacatatatgagtct 4690

Query: 181     tgtttgttactatacaactgttctgaaataagggcagttctgcgcaccaccagctaataa 240
            |||
Sbjct: 4689 tgtttgttactatacaactgttctgaaataagggcagttctgcgcaccaccagctaataa 4630

Query: 241     aatggagagggtgaagatcctctataaccagatgattataagaacttagcatcttctctaa 300
            |||
Sbjct: 4629 aatggagagggtgaagatcctctataaccagatgattataagaacttagcatcttctctaa 4570

Query: 301     gctgttttggatgtctgcttacctcggttttggcattgtgttccagggtatacgatcatcaa 360
            |||
Sbjct: 4569 gctgttttggatgtctgcttacctcggttttggcattgtgttccagggtatacgatcatcaa 4510

Query: 361     ggaagttggtgatggaacatttgggagtg 389
            |||
Sbjct: 4509 ggaagttggtgatggaacatttgggagtg 4481

```

(SCEQRT1024B02.g) SASGMS16343

Color Key for Alignment Scores

Query= (SCEQRT1024B02.g) SASGMS16343 (384 letters)

>contig01995 length=6106 numreads=208
Length = 6106

Score = 704 bits (355), Expect = 0.0
Identities = 376/383 (98%)
Strand = Plus / Plus

```

Query: 2      actgggaaagtcagcaaactgatgccttctttgccgattgtaattgcaactggtgatggg 61
             |||
Sbjct: 4455 actgggaaagtcagcaaactggtgccttctttgccgattgtaattgcaactggtgatggg 4514

Query: 62      gctgcatccagtggggtgaaagaaaacaacaatgacatgagcagttctgctgatgggtct 121
             |||
Sbjct: 4515 gctgcatccagtggggtgaaagaaaacaacaatgacatgagcagttctgctgatgggtct 4574

Query: 122     gtgaagctggatgacagtgaagatgctgtgaagagctcgctgcgggggagtggttaaggat 181
             |||
Sbjct: 4575 gtgaagctggatgacagtgaagatgctgagaagagctcgctgcgggggagtggttaaggat 4634

Query: 182     agtcggtgtctgctaaatgcagtgacagggccaacagcctgtcgaaagccagcgtagt 241
             |||
Sbjct: 4635 agtcggtgtccgctaaatgcagtgacagggccaacagcctgtcgaaagccagcgtagt 4694

Query: 242     gccaaagttagtggtcaacctgctgacatgatcgagagtggcgagagtagcctctatcgg 301
             |||
Sbjct: 4695 gccaaagttagtggtcaacctgctgacatgatcgagagtggcaagagtagcctctatcgg 4754

Query: 302     gcctgtggtggcagtgatgtgagcgatgagagcacctgcagtagcatttgcagcagcgtc 361
             |||
Sbjct: 4755 gccagtggtggcagtgatgtgagcgatgagagcacctgcagtagcatttgcagcagcgtc 4814

```



```

Query: 362 agcaagcctcacaaagtcaaatga 384
          |||
Sbjct: 4815 agcaagcctcacaaagtcaaatga 4837

```

Figura 6: Representação do alinhamento local feito por meio de *blast* dos amplicons obtidos para cada uma das quatro proteínas quinase escolhidas contra o banco de *contigs*, que procura varrer o genoma de cana por meio da técnica de *shotgun*.

O SASGMS16343, codificante para uma *caneG11A kinase*, apesar de não ter tido alinhamento com o genome de sorgo (dados não mostrados), pôde ter seu fragmento de seqüência promotora putativa acrescida de sua *orf* alinhada contra o banco de contigs (Figura 6), o que permitiu também a localização e expansão do trecho promotor baseado em trechos genômicos de cana-de-açúcar, contig 01995 (dados não mostrados).

4.3. Hibridação de amostras segregantes para teor de sacarose na plataforma *Agilent* de chip de oligos

4.3.1. Escolha das amostras utilizadas na hibridação

Progenies foram obtidas por cruzamentos que visavam o aumento no teor de sacarose, utilizando variedades comerciais amplamente conhecidas e 20 indivíduos com os valores extremos de Brix tiveram tecidos coletados em três momentos do desenvolvimento (7, 9 e 11 meses de idade) em meados do ano de 2008 (Figura 7).

Observou-se precocidade nos dez indivíduos do *pool* de alto Brix, uma vez que já no sétimo mês estes apresentam valores de Brix relativamente elevados quando comparados aos de baixo Brix (Figura 8).

RNA total foi extraído de entrenó1 e folha+1 dos indivíduos selecionados para compor os *pools* de alto e baixo Brix, considerando apenas o primeiro instante (7 meses de idade), uma vez que é nesse momento que os grupos de alto e baixo Brix possuem a maior diferença no acúmulo de sacarose (Figura 9 e 10).

Dentre cinco cruzamentos analisados, foram escolhidos o cruzamento I e III em função das características dos progenitores e dos perfis de evolução dos valores médios de Brix, por apresentarem a maior segregação entre os grupos de alto e de baixo Brix no instante 7 meses (Figura 9).

Foram hibridadas amostras de entrenó1 e de folha+1 na plataforma *Agilent* de forma a compor um panorama dos genes diferencialmente expressos em dois tecidos de fundamental importância para o entendimento do processo de acúmulo de sacarose durante o desenvolvimento. Isto porque, folha+1 é a folha mais ativa fotossinteticamente e o entrenó1 o mais jovem dentre os entrenós em desenvolvimento, configurando o mais jovem dreno de sacarose.

Figura 7. Esquema utilizado nas coletas das progênies segregantes para teor de sacarose. ¹: 150 genótipos distintos na fase T1; <10 Brix: os dez indivíduos de menor Brix e >10 Brix: os dez indivíduos de maior Brix. I, II, III, IV e V referem-se aos cruzamentos de mesma nomenclatura.

Figura 8. Valores de Brix das touceiras selecionadas para compor os *pools* de baixo Brix (BB, 10 touceiras) e alto Brix (AB, 10 touceiras) para os 5 cruzamentos realizados, considerando os três pontos de medição (7, 9 e 11 meses de idade). Cross I: C1 x C2; Cross II: C3 x C4; Cross III: C5 x C6; Cross IV: C7 x C8 e Cross V: progênies T₃, de genitores variados.

Figura 9. Valores médios do teor de sacarose referente aos *pools* de dez indivíduos de baixo Brix e de alto Brix para os cinco cruzamentos gerados (I, II, III, IV e V). Os dados de Brix foram coletados em três instantes (7, 9 e 11 meses de idade); — refere-se a alto Brix e — a baixo Brix.

Numericamente, a diferença de Brix na segregação entre os *pools* de alto (AB) e de baixo Brix (BB) no caso do cruzamento III é relativamente maior que as demais, uma vez que a diferença entre o valor médio de Brix do *pool* AB e do *pool* BB é a maior dentre todos os cruzamentos no 7º mês. Isso se mantém até o 9º mês, já que no 11º mês cross I e III têm valores muito semelhantes (Figura 10).

Figura 10. Perfil de segregação entre os *pools* de alto e de baixo Brix, calculado a partir da diferença entre o valor médio do teor de sacarose do *pool* AB menos o valor médio do *pool* BB para cada um dos 5 cruzamentos e para cada um dos 3 instantes para os quais foram feitas medições.

4.3.2. Resultados obtidos a partir das três hibridações realizadas

Três hibridações foram realizadas, todas relativas ao sétimo mês de desenvolvimento abarcando dois dos cinco cruzamentos gerados e mantidos no

CCA-UFSCar: folha+1 e entrenó1 do cruzamento III, e folha+1 do cruzamento I. Todos os experimentos de hibridação seguiram um mesmo desenho experimental (Tabela III). Cada experimento foi feito utilizando-se um dos dois tecidos para os quais se fez coleta: folha+1 e entrenó1. Duas réplicas biológicas (dois colmos fenotipicamente similares e de uma mesma touceira) foram utilizadas (R1 e R2), bem como réplicas técnicas via a troca de corantes concomitante à troca da réplica biológica um (R1) para a dois (R2) (Tabela III).

Tabela III: Desenho experimental geral adotado nas três hibridações realizadas na plataforma Agilent de chip de oligos. As hibridações foram todas *pool* de alto Brix (AB) versus *pool* de baixo Brix (BB); R1: réplica biológica 1; e R2: réplica biológica 2. Baixo brix sempre deve ser tomado como referência na interpretação dos dados.

Cy3		Cy5
<i>Pool</i> BB R1	vs	<i>Pool</i> AB R1
<i>Pool</i> AB R2	vs	<i>Pool</i> BB R2

No total foram obtidos 569 genes como diferencialmente expressos em pelo menos um dos experimentos Agilent, sendo que 21 dos oligos estavam na orientação antisenso e 453 na orientação senso (Tabela IV).

A listagem completa dos genes modulados para segregação de sacarose nas amostras utilizadas encontra-se na Tabela XI, alocada como anexo à dissertação.

Tabela IV: Consolidação dos resultados das hibridações no chip customizado. A1= primeira lâmina criada pelo grupo; CR3= cruzamento III; CR1= cruzamento I; C1= coleta no instante 7 meses; L1= folha+1; In1= entrenó1.

Experimento	Tecido	# SAS	Induzidos	Reprimidos	SS	AS
A1CR3C1L1 (I)	Folha +1	111	26	85	100	1
A1CR3C1In1 (II)	Entrenó 1	206	74	132	199	7
A1CR1C1L1 (III)	Folha +1	252	167	85	154	13
Total	L1+In1	569	267	302	453	21

Como o chip foi customizado com cerca de 14521 ESTs do projeto SUCEST, além dos elementos controle, agrupou-se um elevado número de SAS para os quais ainda não há uma categorização consolidada nos bancos atuais. Assim, a partir das análises foram obtidas porcentagens que variavam entre 65 e 70% de elementos categorizados como Unknown (dados não mostrados); os demais foram hierarquizados de acordo com a extensiva categorização presente no banco SUCEST, que engloba os bancos Swissprot, NR e KEGG/GO (Figuras 11, 12 e 13), lembrando que a proporção entre as categorias não pode ser considerada literalmente, uma vez que essas categorias não possuem representatividade no chip idêntica àquela presente no genoma de cana.

Figura 11. Categorização dos genes diferencialmente expressos para conteúdo de sacarose em folha +1 das progênies do cruzamento I aos 7 meses de idade.

Figura 12. Categorização dos genes diferencialmente expressos para conteúdo de sacarose em entrenó 1 das progênes do cruzamento III aos 7 meses de idade.

Figura 13. Categorização dos genes diferencialmente expressos para conteúdo de sacarose em folha +1 das progênies do cruzamento III aos 7 meses de idade.

Para validação dos dados de expressão e verificação da acurácia do chip Agilent foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (Papini-Terzi *et al.*, 2009), utilizando 15 amostras, que por sua vez englobam 9 diferentes SAS e diferentes condições diferenciais de expressão (i.e., reprimidos ou induzidos). Uma taxa de validação de 87% foi obtida ($p \geq 0,95$) (Tabela V, Figuras 14-17). Vários candidatos a genes normalizadores foram avaliados (60S, UBE2, GAPDH e PUB), e PUB foi o

mais adequado por apresentar a menor variação em sua expressão quando amostras de alto e baixo Brix foram avaliadas por PCR em tempo real. Isto porque os desvios padrão dos valores médios de Ct foram os seguintes: 0,11972 para PUB, 0,77095 para 60S, 0,80081 para GAPDH e 1,00288 para UBE2, tornando absolutamente clara a menor dispersão das curvas no caso de PUB e, portanto, a sua candidatura adequada como gene normalizador para as amostras utilizadas nas hibridações.

Tabela V: Tabela representativa dos pontos experimentais validados por PCR em tempo real. As diferentes cores representam diferentes condições diferenciais de expressão: vermelho para induzido e verde para reprimido, sendo o *pool* de baixo Brix a referência. Quando o gene se mostrou não alterado no chip é indicado como --. A1= versão 1 do chip de oligos; CR1= cruzamento I; CR3= cruzamento III; C1= coleta 1 (7 meses); L1= folha+1; In1= entrenó1.

Código interno para SAS	A1CR1C1L1	A1CR3C1In1	A1CR3C1L1
SASGMS33582	--	Ok	
SASGMS14110	--	Ok	Não validou
SASGMS33885	--	Ok	Ok
SASGMS23274	Ok	--	Ok
SASGMS25700	--	--	Não validou
SASGMS43055	Ok	--	--
SASGMS25989	Ok	--	--
SASGMS37960	--	Ok	Ok
SASGMS24604	Ok	Ok	Ok

A escolha dos alvos para validação se deveu a dois fatores majoritariamente: natureza da categoria funcional e/ou perfil de expressão interessante, fosse pela intensidade da modulação e/ou pelo comportamento da modulação entre os diferentes cruzamentos e/ou tecidos analisados (Tabela VI). As categorias de genes escolhidas foram as seguintes: *unknown* (SASGMS33582, SASGMS14110 e SASGMS23274), resposta a patógenos (SASGMS33885), proteína quinase

(SASGMS25700, SASGMS43055 e SASGMS25989), receptor de proteína quinase (SASGMS24604) e metabolismo secundário (SASGMS37960) (Tabela VI).

Tabela VI: Tabela contendo os genes contemplados pela validação por RT-PCR, com suas respectivas categorizações e perfis de modulação. *Up* para induzido e *down* para reprimido, sendo o *pool* de baixo Brix a referência. Entre parênteses estão os *ratios* das réplicas biológicas R1 e R2. Quando o gene se mostrou não alterado é indicado como --. A1= versão 1 do chip de oligos; CR1= cruzamento I; CR3= cruzamento III; C1= coleta 1 (7 meses); L1= folha +1; In1= entrenó 1.

Código interno para SAS	Category	Sub category 1	Sub category 2	Sub category 3	A1CR1C1L1	A1CR3C1In1	A1CR3C1L1
SASGMS33582	.	.	.	.	--	down (27.0958 , 70.5219)	
SASGMS14110	.	.	.	.	--	down (9.00047 , 17.1484)	down (10.8528 , 8.28212)
SASGMS33885	pathogenicity	R-gene	NADPH HC toxin reductase	EC:1.1.1.219	--	down (22.4711 , 22.6274)	down (2.32947 , 3.45815)
SASGMS23274	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (15.6707 , 2.80889)	--	down (2.62079 , 2.63902)
SASGMS25700	Protein kinase	MAPK/MAPKK/MAPKKK	caneNPK1-6	.	--	--	down (1.71238 , 1.91853)
SASGMS43055	Protein kinase	other	caneNIMA-1 (never in mitosis gene a) related kinase	EC:2.7.11.-	up (2.92817 , 1.77892)	--	--
SASGMS25989	Protein kinase	putative RLCK	caneRLCK-DIX1	EC:2.7.1.-	up (2.96905 , 1.58008)	--	--
SASGMS37960	Secondary metabolism	TPA: putative anthocyanidin reductase	hypothetical protein LOC100191338 [Zea mays] unknown [Zea mays]	NAD-dependent epimerase/dehydratase ; K00091 dihydroflavonol- 4-reductase [EC:1.1.1.219]	--	down (1.6358 , 1.97247)	down (3.18215 , 2.65737)
SASGMS24604	receptor	receptor Ser/Thr kinase	caneSHR5 receptor-3	protein kinase; K08884 serine/threonine protein kinase, bacterial [EC:2.7.11.1]	up (1.61217 , 1.53475)	down (2.51403 , 2.15846)	down (2.26577 , 3.29436)

Figura 14. Gráficos de expressão gênica obtidos por RT-PCR em amostras de baixo Brix (LB) e alto Brix (HB) do cruzamento III para dois tecidos, folha+1 (*leaf+1*) e entrenó1 (*internode1*). PUB foi usado como normalizador; R1: réplica biológica 1; R2: réplica biológica 2. *valor de probabilidade para a comparação das razões de expressão de HB vs LB.

Figura 15. Gráficos de expressão gênica obtidos por RT-PCR em amostras de baixo Brix (LB) e alto Brix (HB) do cruzamento III para dois tecidos, folha+1 (*leaf+1*) e entrenó1 (*internode1*). PUB foi usado como normalizador; R1: réplica biológica 1; R2: réplica biológica 2. *valor de probabilidade para a comparação das razões de expressão de HB vs LB.

Figura 16. Gráficos de expressão gênica obtidos por RT-PCR em amostras de baixo Brix (LB) e alto Brix (HB) dos cruzamentos I e III para folha+1 (*leaf+1*). PUB foi usado como normalizador; R1: réplica biológica 1; R2: réplica biológica 2.

*valor de probabilidade para a comparação das razões de expressão de HB vs LB.

Figura 17. Gráficos de expressão gênica obtidos por RT-PCR em amostras de baixo Brix (LB) e alto Brix (HB) do cruzamento I para folha+1 (*leaf+1*). PUB foi usado como normalizador; R1: réplica biológica 1; R2: réplica biológica 2.

*valor de probabilidade para a comparação das razões de expressão de HB vs LB.

Como o objetivo maior dessa busca por genes interessantes do ponto de vista científico-tecnológico sempre foi o de cobrir um grande número de candidatos de uma só vez, a considerável taxa de sucesso nas validações, além daquelas conduzidas pelo restante do grupo de pesquisa, indica a utilidade da plataforma *Agilent* de oligos para esse propósito, de compor uma lista de genes passíveis de estudos mais profundos *a posteriori*.

5. DISCUSSÃO

5.1. Busca por regiões promotoras como parte dos esforços na montagem de um catálogo de promotores para cana-de-açúcar

Uma vez que a regulação da expressão gênica tem grande importância para o processo de acúmulo de sacarose, o conhecimento de promotores específicos de cana trará recursos essenciais tanto para o entendimento desse mecanismo como para os esforços na geração de linhagens transgênicas. Como principal fonte de recursos para o processo de identificação de regiões promotoras ativas nos diferentes tecidos da cana-de-açúcar há o catálogo de transdução de sinal e genes regulatórios de cana denominado SUCAST (*Sugarcane Signal Transduction Catalogue*) Database, que integra genes, categorizações filogenéticas do quinoma da cana, matriz de expressão, dados de seqüência e domínios (Souza *et al.*, 2001) (<http://sucest-fun.org>).

Há um grande interesse na busca por seqüências promotoras quando se considera os ensaios de transgenia em cana-de-açúcar, tornando muito importante a montagem de um banco de seqüências promotoras que possam ser utilizadas de acordo com o fim almejado. Há os elementos de direção tecido-específica, bem como as sutilezas na modulação de um dado gene providas por essas seqüências promotoras, que promotores constitutivos já utilizados não são capazes de mimetizar.

Os promotores são também de fundamental importância para os estudos que visam elucidar redes regulatórias, uma vez que o conhecimento deles permite compreender grande parte das relações moleculares que compõem a regulação

gênica. Assim sendo, quão maior a quantidade de seqüências promotoras descritas, mais facilmente as inferências de interação na regulação podem ser realizadas. Evidentemente, que os promotores são peças-chave, mas muitíssimos outros fatores compõem a imensa complexidade da regulação gênica, já que o ajuste fino presente na natureza muitas vezes ainda está por ser explicitado.

5.1.1. Uso de BACs na busca por seqüências promotoras

As bibliotecas de BACs consistem de coleções de fragmentos de um genoma, previamente segmentados e alocados em Cromossomos Artificiais de Bactéria ou BACs, a partir dos quais clones são obtidos por transformação. Dessa forma, ajustando-se o número de clones, pode-se alocar todo um genoma em uma biblioteca, a partir da qual se torna exeqüível e facilitada a busca por seqüências específicas, bem como processos de sequenciamento, graças a regiões bem determinadas nos BACs que flanqueiam o sitio de inserção e à possibilidade no desenho de *primers* específicos para um dado gene (Zhang *et al.*, 1996; Tomkins *et al.*, 1999).

As membranas contendo os BACs depositados pontualmente são hibridadas contra sondas marcadas com o radioisótopo ^{32}P nos resíduos de adenosina ou mesmo nos quatro resíduos nucleotídicos, numa técnica denominada varredura por *overgo* (Madishetty *et al.*, 2006). Dessa forma, é possível se obter de forma simplificada possíveis regiões promotoras, presentes na região 5' do local de hibridação da sonda. Os dados depositados no banco do laboratório e utilizados para os ensaios de alinhamento local (i.e., *blast*) referem-se a uma biblioteca para o cultivar R570 de cana-de-açúcar, com cobertura genômica de 1,5x, gerada por um grupo de pesquisa da Clemson University, USA (Tomkins *et al.*, 1999). Alinhamentos múltiplos para uma mesma quinase refletem largamente a alta poliploidia e aneuploidia ($2n=100-130$) da cana, uma vez que em função desse alto número de cópias é natural se esperar variações alélicas.

Apesar de 159 BACs já terem sido seqüenciados e montados, nada garante que o genoma completo tenha sido acessado, muito menos na cobertura desejável.

Mesmo assim, 56 SAS referentes a quinases puderam ser alinhados, em vários BACs, por vários trechos nucleotídicos, já que o algoritmo *Blast* assim opera. Nos alinhamentos, o percentual de identidade variou de 81-100%, e número de bases alinhadas entre 43pb e 1828pb; o maior *e-value* permitido foi de 0,00. Como já ressaltado, essa variação se deve tanto às várias possibilidades de alinhamento de sucesso previstos pelo *blast*, bem como pelo alto número de possíveis alelos para uma mesma quinase.

5.1.2. Seqüenciamento de regiões promotoras via *genome walking*

Uma vez obtidas as bibliotecas adequadamente, a técnica de *genome walking* se torna bastante direta, já que por simples reações em cadeia da polimerase, PCR, torna-se possível a obtenção de fragmentos à montante do início predito de genes de interesse. No caso, dos três escolhidos, apenas um resultou em fragmento que não pode ser alinhado contra o genoma de sorgo (SASGMS16343), podendo ter havido inespecificidade (com menor probabilidade, em virtude de todas as precauções tomadas e supracitadas na seção resultados) ou inexistência desse gene/alelo em sorgo ou ainda variação na região para a qual foram desenhados os *primers* GSP1 e GSP2.

A técnica se mostrou eficaz aliada ao banco *phytozome*, no qual se encontra depositado e anotado o genoma de sorgo, uma vez que se sabe que há alta identidade entre transcritos de cana e sorgo. Como pode-se observar nas Figuras 4 e 5, para os genes SASGMS11561 e SASGMS09047, respectivamente, há notável sintenia entre os transcritos de cana e sorgo evidenciando, inclusive, o mapeamento

das regiões 3' e 5' UTR. Para corroborar a validade de tais seqüências à montante do primeiro éxon desses dois genes em estudo, alinhamentos contra o banco de *contigs* foram realizados (Figura 6). No caso do SASGMS09047, foi possível com essa abordagem a elucidação de um fragmento de aproximadamente 3kb.

5.2. Hibridação de amostras segregantes para conteúdo de sacarose no chip de oligos *Agilent*

As hibridações aqui postas em evidência representam os esforços iniciais na utilização de uma nova plataforma, de oligos, customizada, com um número de elementos muitíssimo superior àquelas previamente utilizadas (Tabela VII). Essa nova tecnologia permitiu ao grupo incluir no chip um número significativamente maior de genes (aproximadamente 8 vezes maior que no chip SUCAST e 3 vezes maior que o chip PITE/SUCAMET) e, portanto, prover uma nova ferramenta de busca em larga escala de genes diferencialmente expressos para condições contrastantes, no caso °Brix, comparando-se *pools* de genótipos de alto Brix contra *pools* de genótipos de baixo Brix, sendo baixo Brix sempre a referência nas análises. Vale ressaltar que os genes presentes nos microarranjos anteriores foram também representados no chip de oligos. Em função da metodologia empregada no chip *Agilent* (Figura 18) e todos os elementos controle de forma a reduzir interferências experimentais, essa plataforma se mostrou eficiente e confiável do ponto de vista da veracidade de seus resultados (taxa de validação de aproximadamente 90%).

Tabela VII: Tabela comparativa da nova plataforma de hibridação utilizada (chip *Agilent* de oligos) com chips anteriores, de cDNA. EC: elementos controle. SUCAST: *Sugarcane Signal Transduction Catalogue*; PITE: Programa de Inovação Tecnológica, junto à FAPESP; SUCAMET: *Sugarcane Catalogue for Metabolism*. SAS: *Sugarcane Assembled Sequences*.

Chip/plataforma	# deposições	# SAS únicos
SUCAST	4600	1880
PITE/SUCAMET	4600	4594
<i>Agilent</i> (60mer oligos)	45220 (1417 EC)	14521

Figura 18. Esquema simplificado do procedimento de amplificação de cRNA, para experimento do tipo duas cores (i.e., utilização de dois fluoróforos em concomitância, Cy3 e Cy5), utilizado no caso das hibridações do chip customizado de cana-de-açúcar (by Roche Technologies). *Sample A*: pool de genótipos de alto Brix; *Sample B*: pool de genótipos de baixo Brix.

5.2.1. Dados de expressão relevantes provenientes das hibridações na plataforma *Agilent* de oligos

Estudos recentes apontam para a importância de trealose-6-fosfato no metabolismo de carboidratos em plantas, já que parece se tratar de uma molécula de sinalização na detecção do status de sacarose no citosol (Paul, 2007, Zhang et al., 2009). Uma *trehalose-6-fosfato-sintase* (*TPS*, SASGMS06547) foi encontrada menos expressa em folhas de plantas de alto Brix no cruzamento III quando comparadas com plantas de baixo Brix (Tabela VIII). Embora a sinalização envolvendo trehalose-6-fosfato ainda não seja totalmente compreendida, parece haver uma relação entre sua quantidade no citosol e o status de sacarose na célula (Lunn, J.E. et al., 2006). Aliada à repressão de *TPS* (SASGMS06547) foi observada a repressão de uma *glicosil-transferase* (SASGMS03058) em entrenó1 do cruzamento III (Tabela VIII), o que pode levar a um acúmulo de UDP-glicose, precursor da reação de conversão de frutose-6-fosfato e UDP-glicose em sacarose-6-fosfato pela ação da sacarose fosfato sintase (SPS). Sacarose-6-fosfato pode então ser convertida a sacarose e fosfato inorgânico pela ação da sacarose fosfato fosfatase (SPP) (Figura 19). Essa hipótese corrobora a repressão de uma *invertase neutra* (SASGMS26585) observada também em folha.

Figura 19. Esquema simplificado das reações das quais participam trealose-6-fosfato-sintase (TPS), glicosil-transferase, sacarose fosfato sintase (SPS) e sacarose fosfato fosfatase (SPP). G6P: glicose-6-fosfato; UDP-G: UDP-glicose; T6P: trealose-6-fosfato; F6P: frutose-6-fosfato; S6P: sacarose-6-fosfato; S: sacarose; e Pi: fosfato inorgânico.

Alguns fatores de transcrição responsivos a auxina também apresentaram maiores níveis de expressão em folha de plantas de alto Brix do cruzamento I (SASGMS00072 e SASGMS14541), o que poderia estar relacionado com a expansão celular nos tecidos dreno, como indicado pelo padrão diferencial de dois genes codificadores para expansinas em folhas do cruzamento I (SASGMS09174 e SASGMS18250), padrão este observado em trabalhos já descritos (Papini-Terzi *et al.*, 2009; Sheen *et al.*, 2006), e uma *celulose sintase* também em folha do cruzamento I (SASGMS11136) (Tabela VIII). Apesar de nenhuma *hexoquinase* ter se mostrado modulada nos experimentos de hibridação, como supracitado, alguns TFs responsivos a auxina mostraram ativação em folha no cruzamento I, podendo também estar envolvidos em processos relacionados a desenvolvimento (Tabela VIII, Figura 21).

Um fator de transcrição WRKY (SASGMS27559) e um da família bZIP (SASGMS07295) foram reprimidos em folhas de plantas de alto Brix nos cruzamentos I e III, respectivamente (Tabela IX). Altos níveis de sacarose intracelular parecem estar associados à repressão de fatores de transcrição do tipo bZIP (Rook *et al.*, 1998), bem como da família WRKY (Sun *et al.*, 2003).

Tabela VIII. Seleção de genes modulados por Brix nos três experimentos de hibridação. As diferentes cores representam diferentes condições diferenciais de expressão: vermelho para induzido e verde para reprimido, sendo o *pool* de baixo Brix a referência. A1= versão 1 do chip de oligos; CR1= cruzamento I; CR3= cruzamento III; C1= coleta 1 (7 meses); L1= folha+1; In1= entrenó1. Após os dizeres *up* e *down*, induzido e reprimido, respectivamente, entre parênteses, estão as razões de expressão das duas réplicas biológicas, R1 e R2.

SAS	category	sub category 1	sub category 2	A1CR1C1L1	A1CR3C1In1	A1CR3C1L1
SASGMS03058	Secondary metabolism	cold-induced glucosyl transferase	glycosyl transferase family protein		down (1.57462 , 1.94127)	
SASGMS06547	carbohydrate metabolism	trehalose metabolism	Trehalose-6-phosphate synthase			down (1.6358 , 1.46003)
SASGMS06613	Carbohydrate metabolism	SIP homologue (AKIN beta)	interacts with the SNF1 complex	up (1.59549 , 1.45397)		
SASGMS26585	Carbohydrate metabolism	neutral invertase	neutral invertase-like protein			down (1.60325 , 1.35379)
SASGMS00072	Transcription Factor	hormone-related/auxin/Aux/IAA	Auxin-responsive protein IAA12	up (1.6358 , 2.39496)		
SASGMS14541	Transcription Factor	hormone-related/auxin/Aux/IAA	Auxin-responsive protein IAA31	up (2.46229 , 1.73027)		
SASGMS09174	.	Expansin-B3; OsEXPB3	unknown [Zea mays]	up (4.08405 , 5.38893)		
SASGMS18250	.	Expansin-B17; OsEXPB17	unknown [Zea mays]	down (1.94801 , 2.36199)		
SASGMS09174	.	Expansin-B3; OsEXPB3	unknown [Zea mays]	up (4.08405 , 5.38893)		
SASGMS11136	Carbohydrate metabolism	Starch and sucrose metabolism	Cellulose synthase	up (7.1602 , 2.23457)		

Outros fatores de transcrição apresentaram modulação bastante interessante. Foi observada a indução de um TF do tipo MYB (SASGMS00064) e de uma α -amilase (SASGMS06685), bem como de uma β -amilase (SASGMS39582) (Tabela IX), o que pode indicar um aumento na disponibilidade de sacarose (Chung-An *et al.*, 2002). É sabido que TFs da família dos AP2 têm seu padrão de expressão modulado pela relação hexoses/sacarose, sendo reprimido quando a relação hexoses/sacarose é alta (Ohto *et al.*, 2005). Assim, é interessante que um elemento dessa família (SASGMS00612) tenha sido induzido em folha (fonte de sacarose, com relações hexose/sacarose baixas, já que é um órgão que exporta sacarose para outros tecidos) e reprimido em entrenó (dreno de sacarose, com relações hexose/sacarose altas, já que importa sacarose) (Tabela IX).

Tabela IX. Seleção de genes modulados por Brix nos três experimentos de hibridação. As diferentes cores representam diferentes condições diferenciais de expressão: vermelho para induzido e verde para reprimido, sendo o *pool* de baixo Brix a referência. A1= versão 1 do chip de oligos; CR1= cruzamento I; CR3= cruzamento III; C1= coleta 1 (7 meses); L1= folha+1; In1= entrenó1. Após os dizeres *up* e *down*, induzido e reprimido, respectivamente, entre parênteses, estão as razões de expressão das duas réplicas biológicas, R1 e R2.

SAS	category	sub category 1	sub category 2	A1CR1C1L1	A1CR3C1In1	A1CR3C1L1
SASGMS00064	Transcription Factor	MYB	Myb-related protein Zm38	up (2.17347 , 1.44794)		
SASGMS06685	Carbohydrate metabolism	Starch and sucrose metabolism	Alpha amylase EC 3.2.1.1	up (5.46416 , 2.04202)		
SASGMS39582	Carbohydrate metabolism	Starch and sucrose metabolism	Beta-Amylase	up (2.2974 , 1.56049)		
SASGMS07295	Transcription Factor	bZIP	RISBZ4/G/HBF-1-related			down (1.83655 , 1.72429)
SASGMS00612	Transcription Factor	hormone-related/ethylene/AP2/EREBP	ethylene-responsive element-binding protein	up (4.56306 , 2.11404)	down (1.48968 , 1.89605)	
SASGMS27559	Transcription Factor	WRKY	WRKY transcription factor 10	down (2.02792 , 1.94396)		

Alguns outros genes exibiram o mesmo perfil de expressão já obtidos anteriormente (Papini-Terzi *et al.*, 2009), incluindo três genes relacionados à síntese de etileno (SASGMS18580, SASGMS00023 e SASGMS00022), duas proteínas fosfatases do tipo PP2C (SASGMS06841 e SASGMS00058) e uma *nitrato redutase* (SASGMS30803) (Tabela X). Uma *caneG11A kinase* também se mostrou induzida em folha+1 de genótipos de mais alto Brix do cruzamento I (SASGMS18936), mostrando um padrão diferencial já visto (Rocha *et al.*, 2007) (Tabela X). Ainda que não totalmente caracterizada, novamente surge como um potencial candidato a estudos mais profundos quanto à segregação no processo de acúmulo de sacarose.

Tabela X. Seleção de genes modulados por Brix nos três experimentos de hibridação. As diferentes cores representam diferentes condições diferenciais de expressão: vermelho para induzido e verde para reprimido, sendo o *pool* de baixo Brix a referência. A1= versão 1 do chip de oligos; CR1= cruzamento I; CR3= cruzamento III; C1= coleta 1 (7 meses); L1= folha+1; In1= entrenó1. Após os dizeres *up* e *down*, induzido e reprimido, respectivamente, entre parênteses, estão as razões de expressão das duas réplicas biológicas, R1 e R2.

SAS	category	sub category 1	sub category 2	A1CR1C1L1	A1CR3C1In1	A1CR3C1L1
SASGMS18580	hormone biosynthesis	ethylene	ACC oxidase	up (2.32947 , 1.37745)		down (1.93053 , 1.51572)
SASGMS00023	hormone biosynthesis	jasmonic acid	Lipoxygenase	up (3.65533 , 2.36199)		
SASGMS00022	hormone biosynthesis	jasmonic acid	Lipoxygenase	up (2.36199 , 1.43893)	up (2.56685 , 2.34567)	
SASGMS18936	Protein kinase	other	caneG11A kinase-6	up (1.93187 , 1.5305)		
SASGMS06841	protein phosphatase	serine/threonine PPM family	PP2C Catalytic Subunit			down (1.71713 , 1.51887)
SASGMS00058	protein phosphatase	serine/threonine PPM family	PP2C-like			down (1.5966 , 1.34723)
SASGMS30803	.	NR [NADH]	nitrate reductase [Zea mays]	down (1.92519 , 1.54007)		
SASGMS04151	.	CIPK14	unknown [Zea mays]			down (1.64947 , 1.89868)
SASGMS00033	Protein kinase	SNF-like kinase	caneOsmotic stress-activated protein kinase-1		down (1.31403 , 1.51047)	

De acordo com a Tabela IX, quatro fatores de transcrição das famílias AP2, bZIP, WRKY e MYB foram identificados como diferencialmente expressos quando genótipos de alto Brix foram comparados com genótipos de baixo Brix. Evidências literárias supracitadas suportam os padrões de modulação obtidos, apesar de que infelizmente nenhuma isoforma de hexoquinase (HXK) pode ser identificada como diferencialmente expressa, apesar de tudo levar a crer ter papel fundamental na sinalização subcelular por açúcares em plantas, inclusive com formas presentes em várias compartimentalizações organelares. HXK1 é um sensor de glicose principalmente associado à mitocôndria, tendo funções no metabolismo glicolítico e, portanto, em situações de catabolismo celular. Também pode ser encontrado presente em complexos de alto peso molecular no núcleo celular, participando ativamente no controle transcricional, junto aos TFs também explicitados, e na degradação do fator de transcrição EIN3 (*ETHYLENE INSENSITIVE3*) via proteossoma.

Uma *trealose fosfato sintase* (TPS, SASGMS06547) se mostrou também modulada em folhas de genótipos de mais alto Brix do cruzamento III, sendo que tal SAS codifica para uma enzima chave na produção de trealose, um osmoprotetor e também importante em respostas à estresses bióticos e abióticos (Sheen *et al.*, 2006). TPS converte glicose-6-fosfato, intermediário de inúmeras vias, dentre as quais a via glicolítica, em trealose-6-fosfato, outro importante intermediário na sinalização por açúcares. Ainda há muitas controvérsias e dados conflitantes para o papel da trealose-6-fosfato e trealose, uma das razões para o aumento de estudos acerca do papel dos mesmos em plantas. Como explicitado na Figura 20, trealose e trealose-6-fosfato têm seus papéis *downstream* às proteínas da família das SnRK1s. As SnRK1s como revelado por meio de uma miríade de trabalhos ainda conserva seu papel de controle via inibição de vias anabólicas em plantas (Barker *et al.*, 1996; Sudgen *et al.*, 1999; e Douglas *et al.*, 1997), sendo capaz de, *in vitro*, fosforilar e inativar HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase), NR (nitrato redutase) e SPS (sacarose fosfato sintase), enzimas envolvidas na síntese de isoprenoides, assimilação de nitrogênio e biossíntese de sacarose, respectivamente (Sudgen *et al.*, 1999). Uma *nitrato redutase* foi reprimida em folha do cruzamento I (SASGMS30803), podendo indicar a atuação de SnRK1s como parte da regulação que resulta no maior teor de sacarose nesses genótipos (Tabela X).

Dois fatores de transcrição responsivos a auxina (SASGMS00072 e SASGMS14541) foram modulados positivamente em genótipos de mais alto Brix em em folha do cruzamento I. Estes devem estar muito provavelmente relacionados com a elongação celular, no processo de estabelecimento de drenos de sacarose (Tabela VIII e Figura 21). Uma *ACC oxidase* (SASGMS18580) se mostrou induzida em folhas+1 em genótipos de mais alto Brix do cruzamento I, tendo a enzima

codificada por esse gene papel fundamental na biossíntese de etileno (Figura 22), um hormônio amplamente presente na transdução de sinais em plantas. Há fortes evidências para a conexão molecular entre a disponibilidade de glicose intracelular e a sinalização por etileno, uma vez que glicose e etileno agem de maneira antagônica quando da regulação do TF EIN3 por estabilidade protéica. O TF EIN3 parece participar da sinalização intranuclear em plantas via degradação por proteossoma (Figura 21) (Yanagisawa *et al.*, 2003).

Figura 21. Modelo proposto por Sheen *et al.*, 2006 para as possíveis interações genéticas entre as cascatas de sinalização de açúcares e hormônios, ABA (ácido abscísico), auxina, citocinina e etileno. As linhas pontilhadas representam meras suposições, ao passo que linhas cheias representam interações positivas (setas) ou negativas (seta com terminação com segmento ortogonalmente retratado).

Duas *lipxygenases* (SASGMS00023 e SASGMS00022) se mostraram moduladas positivamente em folhas+1 de genótipos de mais alto Brix no cruzamento I, o que pode indicar apenas respostas a estresses bióticos e/ou abióticos, uma vez

que respostas a esses estresses em plantas se dão com a presença fundamental, seja local e/ou sistematicamente, de moléculas de ácido jasmônico (Turner, 2002).

Figura 22. Via de biossíntese de etileno em *A. thaliana*, tendo ACC oxidase e ACC sintase como pontos chave na regulação da via, já que uma utiliza o etileno como substrato reacional e outra gera o intermediário ACC, vital para a formação de etileno.

Esforços recentes, sintetizados em um review bastante interessante (Sheard and Zheng, 2009), consolidam as evidências da forma com que ABA e proteínas do tipo SnRK2, exclusivas de plantas, parecem se relacionar via a interação de um complexo de proteínas receptoras que sequestram ABA, permitindo a auto-ativação

de SnRK2 e, portanto, sua atividade fosforilativa em fatores de transcrição de grande importância na transcrição de produtos gênicos responsivos a ABA (Figura 23). Inclusive um gene que codifica para uma proteína quinase dessa família se mostrou reprimido em entrenó1 do cruzamento III (SASGMS00033, Tabela X).

Figura 23. Cascata minimalizada de sinalização por ácido abscísico (ABA) proposto por Laura B. Sheard and Ning Zheng, 2009. **a.** Na ausência de ABA, a fosfatase PP2C fica disponível a inibir a autofosforilação de proteínas da família das SnRK2, exclusiva de plantas. **b.** ABA permite a família de proteínas PYR/PYL/RCAR a ligar-se a PP2C, sequestrando-a, i.e., tornando-a indisponível no meio. Esse sequestro reprime a inibição sobre a quinase da família das SnrK2, que por sua vez pode assim se auto-ativar e consequentemente fosforilar e ativar fatores de transcrição *downstream* (ABF), responsáveis pela iniciação a transcrição via interação com os ABREs (*ABA-responsive promoter elements*).

Há muito se sabe, que ABA está envolvido em processos de estresse abiótico tal como a seca, bem como diversos estudos que apontam para a modulação seletiva de genes do tipo PP2C como resposta a este tipo de estresse. Dessa forma, essas novas evidências interacionais trazem nova luz à forma com que este

importante hormônio vegetal, ABA, e as PP2C (proteínas fosfatase do tipo 2) e SnRK2s interagem para compor a complexa resposta vegetal, num processo ainda não totalmente conhecido em cana-de-açúcar, que envolve processos de resposta a estresse hídrico e os processos que levam ao acúmulo de sacarose. Na prática, todo bom produtor de cana-de-açúcar sabe que desprovido de um período de seca, a produtividade de sacarose cai dramaticamente, outro fato empírico e bastante difundido no meio agrícola que corrobora a interação entre esses dois processos, seca e acúmulo de sacarose.

Foi determinada também a modulação de um gene codificante para a terceira e última subfamília das SNF1-like kinases (SnRKs), a subfamília das SnRK3 (SASGMS04151, Tabela X), subfamília também exclusiva a plantas. Essa CIPK, no caso *CIPK14* parece ter sido reprimida em folha+1 do cruzamento III (Tabela X). As SnRK3s parecem estar envolvidas nas interações moleculares em resposta a ABA, seca e intimamente relacionadas em processos regulados por cálcio, e, portanto, à biossíntese de sacarose (Li *et al.*, 1998).

6. CONCLUSÕES

Os esforços na obtenção de possíveis seqüências promotoras de proteínas quinase surtiram efeito, uma vez que três fragmentos puderam ser obtidos e devidamente seqüenciados. As análises por alinhamento local corroboram a posição à montante dessas seqüências, tendo sido utilizados três bancos distintos para tal: o genoma anotado de sorgo, modelo mais próximo de cana de açúcar (*phytozome.net*), um banco de seqüências genômicas obtidas por *shotgun* e, por último, um banco contendo 159 BACs de cana-de-açúcar. O uso conjunto dessas três fontes de seqüências foi fundamental no processo de validação e expansão dos fragmentos, via *blast*. Tais seqüências destinam-se a integrar o banco de promotores específicos para cana supracitado, esforço importante para futuros avanços no que diz respeito à geração de plantas transgênicas. Conclui-se que o método de *genome walking*, desde que provido de boas bibliotecas genômicas bem como do uso de *primers* adequadamente desenhados, é uma técnica bastante útil quando da obtenção de seqüências promotoras putativas. Configura, portanto, um passo fundamental nos esforços de ampliação desse novo catálogo de promotores em cana-de-açúcar.

Ainda dentro do âmbito de objetivos deste projeto, genes com padrões de modulação interessantes puderam ser selecionados a partir dos três experimentos de hibridação conduzidos na plataforma *Agilent*. Genes envolvidos em vias metabólicas que atraem cada vez mais atenção pela interface com os processos moleculares envolvendo sacarose foram identificados. Vias envolvendo trealose, um metabólito ao qual têm sido imputado papéis controversos no complexo sistema de sinalização de açúcares em plantas, tiveram componentes gênicos identificados

como diferencialmente expressos quando genótipos de alto e baixo brix foram confrontados. Vários genes pertencentes a famílias de fatores de transcrição envolvidas nas interações moleculares envolvendo açúcares foram também identificados. Ademais, um gene da família caneG11 também mostrou-se modulado, representante de uma família de proteínas quinase, ainda que pouco estudadas, mas que têm surgido recorrentemente em hibridações com amostras para segregação de Brix. Sete proteínas quinase mostraram-se moduladas nos experimentos, duas da família das SnRKs puderam ser identificadas (SnRK2 e SnRK3), havendo também a ocorrência de quinases de ciclo celular e da cascata de MAPK/MAPKK/MAPKKK, bem como algumas putativas ou detentoras de motivos de quinase, mas ainda de função desconhecida. Genes envolvidos na via de biossíntese de etileno, bem como nas cascatas de sinalização envolvendo ácido abscísico (valendo ressaltar o papel das SnRK2, tendo um candidato dessa família sido reprimido em entrenó1 de genótipos de mais alto brix, SASGMS00033) também foram identificados com perfis de modulação diferencial.

7. REFERÊNCIAS

1. Assmann SM, Shimazaki K: The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiol* 1999, 119(3):809-816.
2. Barker JH, Slocombe SP, Ball KL, Hardie DG, Shewry PR, Halford NG: Evidence that barley 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase kinase is a member of the sucrose nonfermenting-1-related protein kinase family. *Plant Physiol* 1996, 112(3):1141-1149.
3. Benfey PN, Chua, N.H.: Regulated genes in transgenic plants. *Science* (New York, NY 1989, 244:174-181.
4. Boudsocq M, Lauriere C: Osmotic signaling in plants: multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiol.* 2005, 138(3):1185-1194.
5. Braithwaite KS, Geijskes, R.J., Smith, G.R.: A variable region of the SCBV genome can be used to generate a range of promoters for transgene expression in sugarcane. *Plant Cell Rep* 2004, 23:319–326.
6. Casu RE, Manners, J.M., Bonnett, G.D., Jackson, P.A., McIntyre, C.L., Dunne, R., Chapman, S.C., Rae, A.L., Grof, C.P.L. : Genomics approaches for the identification of genes determining important traits in sugarcane. *Field Crops Research* 2005, 92:137-147.
7. Chung-An Lu *et al.*: Three Novel MYB Proteins with One DNA Binding Repeat Mediate Sugar and Hormone Regulation of Amylase Gene. *The Plant Cell* 2002, 14:1963–1980.
8. Douglas P, Pigaglio E, Ferrer A, Halfords NG, MacKintosh C: Three spinach leaf nitrate reductase-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinases that are required by reversible phosphorylation and/or Ca²⁺ ions. *The Biochemical journal* 1997, 325 (Pt 1):101-109.
9. Felix JM: Análise da expressão gênica envolvida no metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2006.

10. Halford NG, Hardie DG: SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant molecular biology* 1998, 37(5):735-748.
11. Hanggi E, Fleming AJ: Sucrose synthase expression pattern in young maize leaves: implications for phloem transport. *Planta* 2001, 214(2):326-329.
12. Hardin SC, Tang GQ, Scholz A, Holtgraewe D, Winter H, Huber SC: Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: occurrence and possible role as a signal for proteolysis. *Plant J* 2003, 35(5):588-603.
13. Hardin SC, Winter H, Huber SC: Phosphorylation of the amino terminus of maize sucrose synthase in relation to membrane association and enzyme activity. *Plant Physiol* 2004, 134(4):1427-1438.
14. Hardin SC, Huber SC: Proteasome activity and the post-translational control of sucrose synthase stability in maize leaves. *Plant Physiol Biochem* 2004, 42(3):197-208.
15. Hrabak, E.M. et al.: The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* 2003, 132:666–680
16. Huber SC, Huber JL, Liao PC, Gage DA, McMichael RW, Jr., Chourey PS, Hannah LC, Koch K: Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase. Occurrence in vivo and possible regulatory significance. *Plant Physiol* 1996, 112(2):793-802.
17. Jansen RC, Nap JP: Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends Genet* 2001, 17(7):388-391.
18. Lakshmanan P, Geijskes, R.J., Aitken, K.S., Grof, C.L.P., Bonnett, G.D., Smith: Sugarcane Biotechnology: The Challenges and Opportunities. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2005, 41:345–363.
19. Lee EJ, Iai H, Sano H, Koizumi N: Sugar responsive and tissue specific expression of a gene encoding AtCIPK14, an Arabidopsis CBL-interacting protein kinase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2005, 69(1):242-245.
20. Li J, Lee YR, Assmann SM: Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. *Plant Physiol* 1998, 116(2):785-795.

21. Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 1998, 10(8):1391-1406.
22. Liu DW, Oard, S. V., Oard, J. H.: High transgene expression levels in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2. . *Plant Sci* 2003, 165:743–750.
23. Livak K J, Schmittgen, T D: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 2001, 25:402-408.
24. Lunn, J.E. et al. 2006. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 397, 139–148.
25. Madishetty K, Condamine P, Svensson JT, Rodriguez E and Close TJ: An improved method to identify BAC clones using pooled overgos. *Nucleic Acids Research* 2007, 35(1):e5.
26. McMichael RW, Jr., Bachmann M, Huber SC: Spinach Leaf Sucrose-Phosphate Synthase and Nitrate Reductase Are Phosphorylated/Inactivated by Multiple Protein Kinases in Vitro. *Plant Physiol* 1995, 108(3):1077-1082.
27. Moore PH: Temporal and spatial regulation of sucrose accumulation in the sugarcane stem. *Austr J Plant Physiol* 1995, 22:661-679.
28. Neuteboom LW, Kunimitsu, W.Y., Webb, D., Christopher, D.A.: Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. *Plant Sci* 2002, 163:1021-1035.
29. Ohto M, Fischer RL, Goldberg RB, Nakamura K, Harada JJ.: Control of seed mass by APETALA2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005, 102:3123–28.
30. Pagnussat GC, Fiol DF, Salerno GL: A CDPK type protein kinase is involved in rice SPS light modulation. *Physiol Plant* 2002, 115(2):183-189.

31. Papini-Terzi FS, Rocha FR, Vencio RZ, Oliveira KC, Felix Jde M, Vicentini R, Rocha Cde S, Simoes AC, Ulian EC, di Mauro SM et al: Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. *DNA Res* 2005, 12(1):27-38.

32. Papini-Terzi FS, Felix, J. M., Rocha, F. R., Waclawovsky, A. J., Ulian, E. C., Chabregas, S., Falco, M. C., Nishiyama-Jr, M. Y., Vêncio, R. Z. N., Vicentini, R., Menossi, M. e Souza, G. M.: The SUCEST-FUN Project: identifying genes that regulate sucrose content in sugarcane plants. *Proc Int Soc Sugar Cane Technol* 2007, 26.

33. Papini-Terzi, F.S., Rocha, F.R., Vencio, R.Z., Felix, J.M., Branco, D.S., Waclawovsky, A.J., Del Bem, L.E., Lembke, C.G., Costa, M.D., Nishiyama Jr, M.Y., Vicentini, R., Vincentz, M.G., Ulian, E.C., Menossi, M. and Souza, G.M.: Sugarcane genes associated with sucrose content. *BMC Genomics* 2009, 120(10).

34. Paul, M.: Trehalose 6-phosphate. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007, 10:303–309.

35. Rocha FR: Identificação e análise funcional de genes relacionados à transdução de sinais na cana-de-açúcar. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.

36. Rocha FR, Papini-Terzi FS, Nishiyama MY, Jr., Vencio RZ, Vicentini R, Duarte RD, de Rosa VE, Jr., Vinagre F, Barsalobres C, Medeiros AH et al: Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC genomics* 2007, 8:71.

37. Rook F ,Gerrits N, Kortstee A, vanKampen M, Borrias M.: Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J* 1998, 15:253–63.

38. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, pp. 7.19-7.22, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

39. Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF: Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant cell* 2002, 14 Suppl:S401-417.

40. Sheen J, Baena-Gonzalez E, Rolland F.: Sugar Sensing and Signalling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006, 57:675-709.

41. Souza GM, Simoes, A. C. Q. Oliveira, K. C., Garay, H. M., Fiorini, L. C., Gomes, F. S., Nishiyama-Junior, M. Y. and da Silva, A. M. : The sugarcane signal

transduction (SUCAST) catalogue: prospecting signal transduction in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology* 2001, 24:25-34.

42. Sugden C, Donaghy PG, Halford NG, Hardie DG: Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol* 1999, 120(1):257-274.

43. Sun C, Palmqvist S, Olsson H, Boren M, Ahlandsberg S, Jansson C.: A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. *Plant Cell* 2003, 15:2076-92.

44. Tomkins JP, Yu Y, Miller-Smith H, Frisch DA, Woo SS and Wing RA: A bacterial artificial chromosome library for sugarcane. *Theor Appl Genet* 1999, 99:419-424.

45. Toroser D, Athwal GS, Huber SC: Site-specific regulatory interaction between spinach leaf sucrose-phosphate synthase and 14-3-3 proteins. *FEBS letters* 1998, 435(1):110-114.

46. Turner JG, Ellis C and Devoto A.: The Jasmonate Signal Pathway. *Plant Cell* 2002, S153-S164.

47. Vencio RZ, Koide T: HTself: self-self based statistical test for low replication microarray studies. *DNA Res* 2005, 12(3):211-214.

48. Wheals AE, Basso LC, Alves DMG, Amorim HV: Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol* 2001, 17:482-487.

49. Woods A, Munday MR, Scott J, Yang X, Carlson M, Carling D: Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *The Journal of biological chemistry* 1994, 269(30):19509-19515.

50. Yanagisawa S, Yoo SD, Sheen J.: Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* 2003, 425:521-25.

51. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP: Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic acids research* 2002, 30(4):e15.

52. Zhang XQ, Lund AA, Sarath G, Cerny RL, Roberts DM, Chollet R: Soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100): further analysis of its phosphorylation using recombinant and authentic root-nodule enzymes. *Archives of biochemistry and biophysics* 1999, 371(1):70-82.
53. Zhang HB, Choi S, Woo SS, Li Z, Wing RA: Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population. *Mol Breed* 1996, 2:11–24.
54. Zhang Y, Primavesi LF, Jhurreea D, Andralojc PJ, Mitchell R, Powers S, Schluepmann H, Delatte T, Winkler A, Paul MJ.: Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol* 2009, 149:1860–1871.
55. Zheng, N and Sheard LB.: Signal advance for abscisic acid. *Plant biology* 2009, 462(3).
56. 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* L.). *Plant J* 1995, 7(1):97-107.

LISTA DE ANEXOS

Tabela XI: Lista de genes diferencialmente expressos nas três hibridações realizadas na plataforma *Agilent* de oligos. AS: oligo antisenso; SS: oligo senso. Para maiores informações favor remeter-se à documentação principal, i.e., corpo da dissertação (CD-ROM).

Tabela XI: Lista de genes diferencialmente expressos nas três hibridações realizadas na plataforma *Agilent* de oligos. AS: oligo antisenso; SS: oligo senso. Para maiores informações favor remeter-se à documentação principal, i.e., corpo da dissertação.

SAS	correct_cluster	category	sub category 1	sub category 2	sub category 3	A1CR1C1L1	A1CR3C1In1	A1CR3C1L1
GS1_AS_03685_00480	SCQGLR1041B01.g	.	.	.	.		up (1.80625 , 2.53151)	
GS1_AS_06556_05279	SCAGLR1043C07.g	.	.	.	.	down (2.12874 , 1.42603)		
GS1_AS_06760_03282	SCEZRT2020A01.g	.	.	.	.			down (2.05623 , 1.74957)
GS1_AS_12669_04315	SCEPRZ1011F12.g	.	.	.	.	up (4.31691 , 4.50023)		
GS1_AS_17056_08050	SCSFSB1072E01.g	.	.	.	.		down (2.51403 , 5.24157)	
GS1_AS_22999_08089	SCCCFL4089H04.g	.	.	.	.		up (2.65737 , 2.28153)	
GS1_AS_23865_01790	SCSBFL1105G12.g	.	.	.	.	up (2.17347 , 1.41421)		
GS1_SS_00097_00551	SCSGRZ3059A01.g	.	.	.	.	down (2.44528 , 1.95477)		
GS1_SS_00522_13919	SCACSB1038D03.g	.	.	.	.	up (2.11404 , 1.44293)		
GS1_SS_00718_07593	SCQGAD1065H07.g	.	.	.	.	up (10.2674 , 2.02792)		down (1.74836 , 2.53151)
GS1_SS_00985_09355	SCVPLB1020B12.g	.	.	.	.		down (1.457 , 1.59107)	down (1.52098 , 1.68763)
GS1_SS_01520_02572	SCCCRT2004C12.g	.	.	.	.			down (1.75686 , 1.63127)
GS1_SS_01626_01458	SCCCAM1002G07.g	.	.	.	.			down (2.02792 , 1.55294)
GS1_SS_02333_00941	SCEZAM1083F11.g	.	.	.	.	up (2.34567 , 1.76418)		
GS1_SS_02657_14377	SCQGLR2032A09.g	.	.	.	.	up (2.18859 , 2.01391)		
GS1_SS_03690_09865	SCAGHR1019C10.g	.	.	.	.		down (13.3614 , 18.7654)	
GS1_SS_03729_10517	SCAGAM2123G11.g	.	.	.	.	up (6.54322 , 5.73582)		
GS1_SS_05435_08692	SCUTAM2010F11.g	.	.	.	.	down (1.91587 , 1.82893)		
GS1_SS_05725_09732	SCCCCL3001D03.b	.	.	.	.	up (2.96905 , 2.09943)		
GS1_SS_06539_11689	SCEPCL6019G08.g	.	.	.	.		down (9.00047 , 17.1484)	down (10.8528 , 8.28212)

GS1_SS_07867_11892	SCJFHR1033B03.b	.	.	.	.	down (1.73508 , 1.62001)		
GS1_SS_08106_07972	SCJFHR1C08D12.g	.	.	.	.		down (1.79005 , 2.11404)	
GS1_SS_08601_04578	SCSGHR1070G09.g	.	.	.	.			down (1.59992 , 1.48041)
GS1_SS_08668_09040	SCEZLB1012D05.g	.	.	.	.		up (1.48144 , 1.65634)	
GS1_SS_08894_12329	SCCCLR1075G06.g	.	.	.	.	up (2.2974 , 1.84165)		
GS1_SS_09261_13866	SCQGLB1028A07.g	.	.	.	.		down (2.71321 , 1.85446)	
GS1_SS_09343_09069	SCCCST1002H07.g	.	.	.	.	down (2.09943 , 3.45815)	down (1.76908 , 1.54756)	
GS1_SS_09752_11664	SCBFLR1005F12.g	.	.	.	.	up (1.63014 , 1.38799)		
GS1_SS_09858_12618	SCCCLR1C08A11.g	.	.	.	.	down (1.66786 , 1.88557)		
GS1_SS_09979_14413	SCBGLR1113E12.g	.	.	.	.	up (3.50642 , 2.23457)		
GS1_SS_10406_10366	SCJLLR1107F10.g	.	.	.	.			down (3.13834 , 1.41912)
GS1_SS_11320_06842	SCCCLR2C03D03.g	.	.	.	.		up (2.75108 , 4.37717)	
GS1_SS_12258_09006	SCJFST1014A02.b	.	.	.	.		up (3.34035 , 3.20428)	
GS1_SS_12859_09283	SCAGRT2041F09.g	.	.	.	.	up (2.49666 , 1.77522)		
GS1_SS_12970_02891	SCJLRZ1027F06.g	.	.	.	.		down (4.82323 , 3.11666)	
GS1_SS_13463_01995	SCSFBS1102C12.g	.	.	.	.		up (1.58118 , 1.62563)	
GS1_SS_13781_03122	SCRURT2006H09.g	.	.	.	.	up (4.40762 , 2.14355)		down (3.27161 , 3.65533)
GS1_SS_14365_12782	SCEZRZ1016E04.g	.	.	.	.		up (2.09943 , 1.78262)	
GS1_SS_14744_11252	SCJLRZ1027E06.g	.	.	.	.	up (3.05252 , 1.67249)		
GS1_SS_15193_03735	SCSGST1071G07.g	.	.	.	.		down (1.36226 , 1.44794)	
GS1_SS_16741_08505	SCAGAM2122H01.g	.	.	.	.			up (1.56699 , 1.43594)
GS1_SS_17961_09967	SCMCST1057H05.g	.	.	.	.		up (1.48247 , 1.42405)	
GS1_SS_20816_04573	SCCCRZ3004F06.g	.	.	.	.		down (1.98069 , 1.59438)	down (3.24901 , 1.95071)
GS1_SS_21213_10141	SCRFST1041C02.g	.	.	.	.		down (1.91322 , 1.68997)	

GS1_SS_21344_07588	SCUTFL1055C05.g	.	.	.	.	.	.	down (5.9794 , 8.87656)
GS1_SS_21389_14218	SCQGFL1096F04.g	.	.	.	.	.	up (3.94493 , 3.38698)	
GS1_SS_22761_08741	SCQSFL3034F02.b	.	.	.	.	.	up (1.3491 , 1.33515)	
GS1_SS_22906_09261	SCRUFL3069A10.g	.	.	.	.	.	down (27.0958 , 70.5219)	
GS1_SS_23105_10762	SCACFL5031C04.g	.	.	.	.	.	up (1.62338 , 2.09943)	up (3.03143 , 2.08493)
GS1_SS_23294_03717	SCSGFL5C04E01.g	.	.	.	.	.	up (2.12874 , 1.32225)	
GS1_SS_23314_00831	SCEQFL5047A11.g	.	.	.	.	up (2.21914 , 1.66324)		
GS1_SS_23456_12958	SCEZLR1052G06.g	.	.	.	.	.	up (1.51677 , 1.28877)	
GS1_SS_24354_05777	SCQSFL3036D03.g	.	.	.	.	.		down (1.74231 , 1.34443)
GS1_SS_24610_11320	SCBGLB2011F08.g	.	.	.	.	.	down (1.77276 , 1.67249)	
GS1_SS_25181_11691	SCRURT2006B11.g	.	.	.	.	up (6.32033 , 1.43893)		
GS1_SS_25442_07597	SCJLST1019A04.g	.	.	.	.	.	down (3.18215 , 2.49666)	
GS1_SS_26121_02975	SCSGLV1008C08.g	.	.	.	.	up (2.67586 , 1.53368)		
GS1_SS_26292_06600	SCACSD2014F07.g	.	.	.	.	.	down (3.01049 , 8.57419)	down (23.9176 , 23.7524)
GS1_SS_25632_12776	SCRFSD1022C11.g	.	.	branched-chain amino acid aminotransferase [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	.	up (1.88035 , 1.65061)		
GS1_SS_04826_14206	SCRFAM2070C04.g	.	.	H0413E07.2 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] H0306F03.13 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] hypothetical protein OsI_017010 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.	.	down (1.55294 , 1.33978)	

GS1_SS_18627_03288	SCCCAM1C03F09.g	.	.	hAT family dimerisation domain containing protein [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	.		up (2.20381 , 1.77522)	up (2.11404 , 2.01391)
GS1_AS_20092_00178	SCSBFL1039G06.g	.	.	hypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group] hypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group]	.		down (4.62675 , 3.45815)	
GS1_SS_06604_05387	SCEPCL6025D11.g	.	.	hypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group] hypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group]	.		down (1.76786 , 2.56685)	
GS1_SS_12997_06596	SCEQRT2027E11.g	.	.	hypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group] hypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group] hypothetical protein OsJ_001613 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.		down (2.18859 , 3.75809)	
GS1_SS_01284_12339	SCRLLR1110H11.g	.	.	hypothetical protein LOC100191278 [Zea mays] unknown [Zea mays]	.	up (9.06307 , 2.96905)		
GS1_SS_16190_13335	SCRULB1059E01.g	.	.	hypothetical protein LOC100191481 [Zea mays] unknown [Zea mays]	TPR repeat- containing protein	up (2.23457 , 1.95206)		

GS1_SS_22777_13393	SCJLLR1107G06.g	.	.	hypothetical protein LOC100192571 [Zea mays] unknown [Zea mays] unknown [Zea mays]	.	up (2.09943 , 1.57571)		
GS1_SS_03365_04750	SCVPAM1055E11.g	.	.	hypothetical protein LOC100192806 [Zea mays] unknown [Zea mays]	.	up (1.74957 , 2.63902)		
GS1_SS_13550_07032	SCMCRT2086H06.g	.	.	hypothetical protein LOC100192824 [Zea mays] unknown [Zea mays]	.		up (2.34567 , 1.62001)	
GS1_SS_22425_14317	SCJLFL3014C12.g	.	.	hypothetical protein LOC100193348 [Zea mays] unknown [Zea mays]	.		down (2.08493 , 1.88949)	
GS1_SS_02223_11688	SCBGHR1060C04.g	.	.	hypothetical protein LOC100193975 [Zea mays] unknown [Zea mays]	.	down (1.82387 , 1.47631)		
GS1_SS_07549_05544	SCCCHR1004H04.g	.	.	hypothetical protein LOC100194378 [Zea mays] unknown [Zea mays]	hypothetical protein	up (2.65737 , 2.20381)		
GS1_SS_21928_13752	SCEZAM2034A03.g	.	.	hypothetical protein Osl_000429 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.		down (2.56685 , 7.06162)	

GS1_SS_14466_12096	SCJLRZ1019G04.g	.	.	hypothetical protein Osl_001755 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] hypothetical protein OsJ_001606 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	hypothetical protein	down (2.02792 , 1.74352)		
GS1_SS_24689_14078	SCRLLB2031A02.g	.	.	hypothetical protein Osl_004299 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] hypothetical protein OsJ_003937 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.	down (2.39496 , 2.58471)		
GS1_SS_21160_11123	SCSFAD1108F01.g	.	.	hypothetical protein Osl_008909 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.		down (2.42839 , 5.09824)	
GS1_SS_16325_07364	SCUTST3089H07.g	.	.	hypothetical protein Osl_009930 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.			up (1.61217 , 1.43794)
GS1_SS_14185_10664	SCCCRZ1002D11.g	.	.	hypothetical protein Osl_013997 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.	down (1.74352 , 1.58227)		
GS1_SS_24287_11029	SCJLFL4183G10.g	.	.	hypothetical protein Osl_014192 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.	down (3.50642 , 2.86791)		

GS1_SS_19831_06972	SCJFRZ2012C02.g	.	.	hypothetical protein Osl_015258 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.		up (1.35849 , 1.35285)	
GS1_SS_14378_10592	SCJFRZ1005A12.g	.	.	hypothetical protein Osl_015605 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.	down (3.53081 , 2.88786)		
GS1_SS_15305_05118	SCJLRT1006B11.g	.	.	hypothetical protein Osl_020131 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.			down (2.04202 , 2.28153)
GS1_SS_08332_12007	SCEZLB1006C12.g	.	.	hypothetical protein Osl_021225 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.		down (1.29146 , 1.70645)	
GS1_SS_02882_14423	SCQGST1032B09.g	.	.	hypothetical protein Osl_021995 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.		up (1.4025 , 1.53688)	
GS1_SS_24521_13826	SCEQRT3C03D06.g	.	.	hypothetical protein Osl_030404 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.	up (2.86791 , 2.71321)		
GS1_SS_09958_09159	SCBGLR1112A01.g	.	.	hypothetical protein Osl_031007 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.		down (3.5801 , 6.32033)	
GS1_SS_00917_10502	SCEZRZ3019D08.g	.	.	hypothetical protein Osl_033876 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.	down (2.01391 , 2.23457)		down (1.58777 , 1.52414)

GS1_SS_00943_09461	SCRLAM2049E07.g	.	.	hypothetical protein Osl_033876 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.	down (2.37841 , 2.92817)		
GS1_SS_09339_06300	SCVPRZ2042F07.g	.	.	hypothetical protein OsJ_010223 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.	up (2.42839 , 1.64718)		
GS1_SS_24385_14343	SCCCFL1097H04.g	.	.	hypothetical protein OsJ_010742 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.	up (3.11666 , 1.50316)		
GS1_SS_07451_11527	SCEQLR1092F11.g	.	.	hypothetical protein OsJ_011924 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.	up (2.56685 , 2.17347)	down (1.39378 , 1.67481)	
GS1_SS_16713_12056	SCBFSB1045A05.g	.	.	hypothetical protein OsJ_012928 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.		down (1.52414 , 2.41162)	
GS1_SS_25008_05086	SCRURT3063D02.g	.	.	hypothetical protein OsJ_017815 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	hydrolase alpha/beta fold domain-containing protein	down (1.66094 , 1.41323)		
GS1_SS_16980_02565	SCQGSB1066A02.g	.	.	hypothetical protein OsJ_023246 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.	up (6.86852 , 2.71321)		
GS1_SS_14819_08345	SCJFRZ2010G07.g	.	.	hypothetical protein OsJ_030119 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.			down (4.37717 , 2.49666)

GS1_SS_11714_11170	SCCCRT1002D07.g	.	.	hypothetical protein OsJ_034997 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.	down (1.94127 , 1.73989)		
GS1_SS_06528_02894	SCEPCL6018D09.g	.	.	INDETERMINATE- related protein 7 [Zea mays] INDETERMINATE- related protein 7 [Zea mays]	.		down (2.92817 , 2.90794)	
GS1_SS_02505_10985	SCEPLR1008A11.g	.	.	kinesin heavy chain [Zea mays]	.	down (2.73208 , 3.07375)		
GS1_SS_09886_05399	SCVPLR2005D10.g	.	.	ORF45d [Pinus koraiensis] ORF45d [Pinus koraiensis]	.		down (1.34817 , 1.72668)	
GS1_SS_16958_13891	SCJFSB1013H11.g	.	.	Os01g0132200 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] Os01g0132200 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	.	up (2.39496 , 2.47942)		
GS1_SS_15871_13830	SCJFRZ3C06A10.g	.	.	Os01g0793800 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] unknown protein [Oryza sativa Japonica Group] Os01g0793800 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] hypothetical protein OsJ_003636 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	.	up (1.61552 , 1.51992)		down (1.70882 , 2.86791)

GS1_AS_02033_04412	SCEZLR1052F03.g	.	.	Os01g0826000 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] unknown protein [Oryza sativa Japonica Group] ATX protein [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] Os01g0826000 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] hypothetical protein OsI_004186 [Oryza sati	.		down (5.57897 , 3.03143)	
GS1_SS_21812_05109	SCRUFL4020A05.g	.	.	Os01g0885600 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] hydrolase- like protein [Oryza sativa Japonica Group] Os01g0885600 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	hydrolase, alpha/beta fold family protein	down (1.53688 , 1.51257)		
GS1_SS_20998_14023	SCJLFL1048F05.g	.	.	Os03g0109900 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] Os03g0109900 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	.		up (1.99585 , 1.68063)	

GS1_AS_16593_07561	SCVPRZ3027E07.g	.	.	Os04g0586500 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] OSJNBa0013K16.1 8 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] Os04g0586500 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] hypothetical protein OsJ_029564 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	.	down (2.34567 , 2.07053)		
GS1_SS_18323_02083	SCCST2004G03.g	.	.	Os04g0634800 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] OSJNBa0043L09.1 6 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] H0410G08.1 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] H0315F07.8 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] Os04g0634800 [Oryza sativa (japonica c	.	up (8.45614 , 1.6077)		down (2 , 1.70055)
GS1_SS_22876_02160	SCQSHR1022A01.g	.	.	Os07g0190600 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] DNA binding protein-like [Oryza sativa Japonica Group] Os07g0190600 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	.		down (1.95613 , 1.40737)	

GS1_SS_00894_14222	SCRLLR1038D02.g	.	.	Os08g0546900 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] Os08g0546900 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	.		down (1.63354 , 1.40834)	
GS1_SS_08639_06597	SCCCCL4017H07.g	.	.	OSJNBb0003B01.2 0 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] hypothetical protein OsJ_015636 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	.		down (3.18215 , 3.05252)	down (5.1337 , 3.27161)
GS1_SS_03908_11069	SCQGHR1014F01.g	.	.	PHD-finger family protein, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	.		up (1.36794 , 1.41814)	
GS1_SS_10762_14217	SCMCLR1010D01.g	.	.	polyprotein [Oryza australiensis]	.		up (1.71713 , 3.73213)	
GS1_SS_00636_12830	SCJFLR1035G09.g	.	.	putative mutator protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.		down (2.32947 , 2.28153)	
GS1_SS_06096_02741	SCCCCL4001D06.g	.	.	putative phi-1 [Oryza sativa Japonica Group]	.	up (2.9897 , 1.42109)		down (1.92385 , 1.84421)
GS1_SS_00900_06168	SCRUAD1060D08.b	.	.	rust resistance protein rp3-1 [Zea mays]	.	up (3.43426 , 1.70645)		
GS1_AS_08771_03997	SCEQRZ3089H09.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		up (21.8566 , 2.69447)	
GS1_SS_00467_09437	SCCCRZ1003E11.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.83783 , 2.07053)	down (1.8609 , 1.63014)
GS1_SS_01194_13584	SCCCCL3003C03.b	.	.	unknown [Zea mays]	.		up (1.77276 , 1.72907)	
GS1_SS_01211_13210	SCSFAD1069H10.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	down (1.79876 , 1.40639)		
GS1_SS_01351_00224	SCSGAD1007C09.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.74473 , 1.54864)	down (3.05252 , 1.8264)
GS1_SS_01384_10946	SCSGAD1007F02.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.53262 , 3.94493)	

GS1_SS_01501_02824	SCUTAD1032E08.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (2.32947 , 1.499)	
GS1_SS_01813_10587	SCBGAM1093E09.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.27633 , 1.47734)	
GS1_SS_01867_08709	SCCCRZ2C04C11.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.41814 , 1.48349)	
GS1_SS_02008_10627	SCEPAM1023G09.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (2.47942 , 1.86219)	
GS1_SS_03123_01911	SCACLR1128A09.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	down (2.18859 , 1.87774)		
GS1_SS_03816_12132	SCBFAM2023G08.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (3.81055 , 3.27161)		
GS1_SS_03989_07254	SCEPAM2014D11.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	down (1.56374 , 1.82893)		
GS1_SS_04596_09762	SCQGAM2028C07.g	.	.	unknown [Zea mays]	.			down (1.93992 , 2.25012)
GS1_SS_07269_13869	SCCCRZ1001A02.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (3.38698 , 1.84038)		down (1.44093 , 1.70764)
GS1_SS_07558_11971	SCUTRZ3070F02.g	.	.	unknown [Zea mays]	.			down (2.23457 , 1.56699)
GS1_SS_08653_08614	SCSGHR1072B11.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.76174 , 1.94127)	
GS1_SS_08988_05001	SCCCLB1004H06.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.50004 , 1.80375)	
GS1_SS_09316_07718	SCUTRZ2023H03.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.27103 , 1.39668)	
GS1_SS_09460_14046	SCQGLB1029D12.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.9711 , 2.47942)	
GS1_SS_09952_05212	SCBGLR1119A10.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (10.3388 , 2.47942)		down (2.71321 , 1.38511)
GS1_SS_10093_10376	SCCCLR1024C07.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (1.56266 , 1.46713)		
GS1_SS_10230_06550	SCCCLR1070H01.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	down (1.82766 , 1.40737)		
GS1_SS_10359_08785	SCEQLR1050B01.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (10.2674 , 1.75443)		down (3.83706 , 3.605)
GS1_SS_10380_14287	SCVPLR2012E12.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (1.55401 , 1.65634)		
GS1_SS_10899_12734	SCEZLB1007D12.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (1.805 , 1.50525)		
GS1_SS_11323_12949	SCCCLR2C03D07.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (4.92458 , 1.54435)		
GS1_SS_11342_08704	SCACLR2014F01.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (2.78949 , 2.26577)	
GS1_SS_11437_11716	SCEQRT2029C02.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (2.80889 , 1.60214)		
GS1_SS_11760_12068	SCMCRT2103F01.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (7.56846 , 1.60547)	down (1.9172 , 3.29436)	down (2.08493 , 2.88786)

GS1_SS_12164_09995	SCCCLR2004B09.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (2.46229 , 1.85703)		
GS1_SS_12237_04786	SCJFRT1011E05.b	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.40056 , 1.44393)	
GS1_SS_12299_12089	SCRLLR1038F07.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.48349 , 1.5305)	down (1.50838 , 2.08493)
GS1_SS_13413_13954	SCCCRT1002C10.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (1.73508 , 1.44093)		
GS1_SS_13735_12636	SCQSRT2035D11.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	down (1.65519 , 1.58118)		
GS1_SS_13917_13749	SCCCRZ1002B01.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (2.36199 , 2.17347)		
GS1_SS_14714_13636	SCBFRZ2046A04.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (1.68646 , 2.17347)		
GS1_SS_14876_01578	SCJFRZ2013G01.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (5.42642 , 1.51362)		
GS1_SS_14996_13074	SCCCCL4012A05.g	.	.	unknown [Zea mays]	.			down (1.76541 , 1.68063)
GS1_SS_15402_12960	SCJLRZ1024B02.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		up (1.76418 , 1.81252)	
GS1_SS_15612_11721	SCEZRZ3051B08.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (1.85446 , 1.50004)		
GS1_SS_15896_10232	SCQSLR1089H10.g	.	.	unknown [Zea mays]	.			down (2.60268 , 2.14355)
GS1_SS_16074_08640	SCRULR1020E05.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		up (1.36037 , 1.71238)	
GS1_SS_16641_03316	SCCCLR1C04D07.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (1.86607 , 1.94666)	up (1.57352 , 2.80889)	
GS1_SS_16660_13328	SCJLLR1108B01.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (15.6707 , 2.80889)		down (2.62079 , 2.63902)
GS1_SS_16883_02602	SCCCLB1003G12.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (2.58471 , 1.63807)		
GS1_SS_17262_00357	SCBFRZ2019C12.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.55833 , 2.2974)	
GS1_SS_17490_08923	SCCCST1002D05.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.93858 , 1.61328)	
GS1_SS_17756_04201	SCJFST1048H01.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		up (17.0299 , 4.28709)	up (9.71356 , 9.91766)
GS1_SS_18032_12654	SCRLAD1098D06.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (1.82766 , 1.8)		
GS1_SS_18140_10714	SCSFST1064G12.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (6.72717 , 1.95342)		
GS1_SS_18150_04075	SCSFST1066C11.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (2.60268 , 1.95342)	down (1.6783 , 1.4651)	
GS1_SS_18363_03175	SCCCRZ1002F07.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.59549 , 1.94262)	
GS1_SS_18865_10717	SCCCLR1024E01.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (2.67586 , 1.9711)		

GS1_SS_18992_11849	SCUTST3092G01.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (2.37841 , 1.69819)		
GS1_SS_19466_04629	SCEZSB1090C08.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (2.23457 , 1.6358)		
GS1_SS_19544_12238	SCEZAD1081D01.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	down (1.85961 , 1.39668)		
GS1_SS_20520_11677	SCSFSB1097H04.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (2.51403 , 2.08493)		
GS1_SS_22603_06291	SCEZLB1008E02.g	.	.	unknown [Zea mays]	.			down (2.32947 , 1.73628)
GS1_SS_22617_13999	SCJLRZ1024B01.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (1.85961 , 2.15846)	
GS1_SS_23624_10667	SCUTRZ2024A08.b	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (2.63902 , 1.70409)		
GS1_SS_23737_13283	SCEQRT2091H12.g	.	.	unknown [Zea mays]	.			down (2.08493 , 2.23457)
GS1_SS_23920_14283	SCBGLR1099B12.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		up (11.7942 , 4.75683)	
GS1_SS_24156_02092	SCBFFL1144D08.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (2.73208 , 1.63127)	
GS1_SS_24406_09969	SCVPAM2067B11.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		up (1.58447 , 1.42208)	
GS1_SS_24791_07924	SCAGRT3048G05.g	.	.	unknown [Zea mays]	.			up (1.73628 , 1.62001)
GS1_SS_25326_10960	SCSBSD1031D11.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		down (2.02792 , 1.82893)	
GS1_SS_25413_09718	SCQGSB1141F01.g	.	.	unknown [Zea mays]	.	up (3.50642 , 1.40834)		
GS1_SS_25726_03414	SCSBSD1055B06.g	.	.	unknown [Zea mays]	.		up (1.71832 , 1.69937)	
GS1_SS_05810_08429	SCCCCL3003H07.b	.	.	unknown [Zea mays]	hypothetical protein		down (1.36888 , 1.50733)	
GS1_SS_01337_12629	SCSGRT2062A03.g	.	.	unknown [Zea mays]	protein kinase (EC:2.7.11.1)	up (1.51992 , 1.39281)		
GS1_SS_03115_11114	SCVPRZ2038C03.g	.	.	unknown [Zea mays]	TPR domain-containing protein	down (1.93187 , 1.457)	down (2.17347 , 1.68413)	
GS1_SS_07023_01108	SCCCCL3002F05.b	.	.	unknown [Zea mays]	TPR domain-containing protein	up (12.7286 , 3.50642)		
GS1_SS_08739_04099	SCEQRT2092H02.g	.	.	unknown [Zea mays]	unknown protein	up (3.13834 , 1.84548)		
GS1_SS_24536_12695	SCEQRT2027C06.g	.	.	unknown [Zea mays] unknown [Zea mays]	.			down (2.08493 , 1.49589)

GS1_SS_10381_13545	SCCCLR2001C04.g	.	17.8 kDa class II heat shock protein	hypothetical protein LOC100191598 [Zea mays] unknown [Zea mays]	.	up (2.39496 , 1.53901)	up (1.32134 , 1.84805)	
GS1_SS_09639_06668	SCCCLR2004G08.g	.	20 kDa chaperonin, chloroplastic; Chaperonin 20; Protein Cpn21; Chaperonin 10; Protein Cpn10; Ch-CPN10;	unknown [Zea mays]	groES; co-chaperonin GroES ; K04078 chaperonin GroES	down (1.91587 , 1.45095)		
GS1_SS_00996_13218	SCRUAD1063A09.g	.	30S ribosomal protein S21, chloroplastic	unknown [Zea mays]	.	down (2 , 1.48761)		
GS1_SS_08401_11313	SCRUHR1076H05.g	.	3-ketoacyl-CoA synthase 17; KCS-17; Very long-chain fatty acid condensing enzyme 17; VLCFA condensing enzyme 17	Os05g0574600 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] putative beta-ketoacyl synthase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os05g0574600 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] hypothetical protein OsJ_018848 [Oryza sativa (japonica cultivar-grou	.		up (2.12874 , 3.31728)	
GS1_SS_25678_10333	SCAGSD2043H04.g	.	3-ketoacyl-CoA synthase 19; KCS-19; Very long-chain fatty acid condensing enzyme 19; VLCFA condensing enzyme 19	hypothetical protein Osl_009888 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.		up (2.42839 , 5.02805)	
GS1_SS_02406_12748	SCJLRZ1021F11.g	.	50S ribosomal protein L18, chloroplastic; CL18;	unknown [Zea mays]	rplR; 50S ribosomal protein L18 ; K02881 large subunit ribosomal protein L18	down (1.55725 , 1.84421)		

GS1_SS_05369_11779	SCUTAM2007G01.g	.	50S ribosomal protein L34, chloroplastic; CL34;	unknown [Zea mays]	LSU ribosomal protein L34P ; K02914 large subunit ribosomal protein L34	down (1.60993 , 1.78015)		
GS1_SS_22510_03436	SCRFLR1034H12.g	.	50S ribosomal protein L6, chloroplastic; Protein EMBRYO DEFECTIVE 2394;	unknown [Zea mays]	rpl6; 50S ribosomal protein L6 ; K02933 large subunit ribosomal protein L6			up (1.51047 , 1.3566)
GS1_SS_10220_10945	SCCCLR1069H11.g	.	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate--homocysteine methyltransferase; Vitamin-B12-independent methionine synthase isozyme; Cobalamin-independent methionine synthase isozyme	putative aphid transmission factor [Sugarcane yellow leaf virus] putative aphid transmission factor [Sugarcane yellow leaf virus]	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate--homocysteine methyltransferase (EC:2.1.1.14); K00549 5-methyltetrahydropteroyltryglutamate--homocysteine methyltransferase [EC:2.1.1.14]	down (18.3792 , 2.53151)		
GS1_SS_03113_02612	SCCCCL4015F02.g	.	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate--homocysteine methyltransferase; Vitamin-B12-independent methionine synthase isozyme; Cobalamin-independent methionine synthase isozyme	unknown [Zea mays]	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate--homocysteine methyltransferase (EC:2.1.1.14); K00549 5-methyltetrahydropteroyltryglutamate--homocysteine methyltransferase [EC:2.1.1.14]	up (2.01391 , 1.82134)		
GS1_SS_07966_02619	SCJFHR1C03E12.b	.	6-phospho-beta-galactosidase; Beta-D-phosphogalactoside galactohydrolase; PGALase; P-beta-Gal; PBG	unknown [Zea mays]	beta-glucosidase A (EC:3.2.1.21); K05350 beta-glucosidase [EC:3.2.1.21]	up (1.48144 , 1.47223)	down (3.43426 , 5.77572)	
GS1_SS_21494_09643	SCRLAM1012C07.g	.	ABC transporter F family member 4	hypothetical protein OsI_027714 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]				up (1.78757 , 1.48247)

GS1_SS_20554_02815	SCSGHR1072E12.g	.	Abhydrolase domain-containing protein 6-A	unknown [Zea mays]	alpha/beta hydrolase fold	up (4.05584 , 2.86791)		
GS1_SS_16222_07773	SCRFRZ3058E03.b	.	Absciscic acid 8'-hydroxylase 1; ABA 8'-hydroxylase 1; OsABA8ox1; Cytochrome P450 707A5 Absciscic acid 8'-hydroxylase 1; ABA 8'-hydroxylase 1; OsABA8ox1; Cytochrome P450 707A5	unknown [Zea mays]	.	up (1.98894 , 3.41054)		
GS1_SS_08540_01265	SCSGHR1068H03.g	.	Acyl carrier protein, mitochondrial; MtACP 1; ACP; NADH-ubiquinone oxidoreductase 9.6 kDa subunit;	unknown [Zea mays]	acyl carrier protein; K02078 acyl carrier protein			down (2.77022 , 2.47942)
GS1_SS_25739_09642	SCMCSD1059G09.g	.	Alcohol dehydrogenase-like 4	Os10g0159800 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Alcohol dehydrogenase 2, putative, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os10g0159800 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	formaldehyde dehydrogenase (glutathione) (EC:1.2.1.1); K00001 alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]; K00121 S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase [EC:1.1.1.284]			up (1.92385 , 1.44995)
GS1_SS_02399_11235	SCVPCL6042F02.g	.	Ankyrin repeat-containing protein At3g12360	unknown [Zea mays]	ankyrin repeat-containing protein	down (1.60214 , 1.59218)		
GS1_SS_05642_03559	SCEZLB1010C01.g	.	Annexin D4; AnnAt4	unknown [Zea mays]	.			down (1.6077 , 1.3435)
GS1_SS_08544_11429	SCSGHR1068B07.b	.	Anter-specific proline-rich protein APG;	unknown [Zea mays]	GDSSL family lipase (EC:2.3.1.43)		down (2.78949 , 2.46229)	
GS1_SS_25259_10538	SCRLSD1011C02.g	.	Anter-specific proline-rich protein APG;	unknown [Zea mays]	lipolytic protein			down (1.8025 , 1.82513)

GS1_SS_21400_13182	SCQGFL1096G10.g	.	Aquaporin PIP2-1 (Plasma membrane intrinsic protein 2-1) (ZmPIP2-1) (ZmPIP2;1)	unknown [Zea mays]	.		down (1.49071 , 1.67018)	
GS1_SS_01524_13350	SCUTAD1033F08.g	.	ASC1-like protein 3; Alternaria stem canker resistance-like protein 3	hypothetical protein LOC100192594 [Zea mays] unknown [Zea mays] unknown [Zea mays]	.	down (2.17347 , 1.75808)		
GS1_SS_01086_03506	SCSBLB1031A02.g	.	Aspartic proteinase nepenthesin-1; Nepenthesin-I;	hypothetical protein OsJ_002400 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.		up (1.65061 , 1.64035)	
GS1_SS_10736_09278	SCVPLR1049D04.g	.	Aspartic proteinase nepenthesin-2; Nepenthesin-II;	hypothetical protein Osl_022874 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.	up (2.9897 , 2.14355)		
GS1_SS_03454_14060	SCMCLR1123H12.g	.	Aspartic proteinase nepenthesin-2; Nepenthesin-II;	unknown [Zea mays]	.	up (2.34567 , 1.95342)		
GS1_SS_09906_02227	SCBGLR1097G03.g	.	Aspartic proteinase nepenthesin-2; Nepenthesin-II;	unknown [Zea mays]	.		up (1.48452 , 1.42109)	
GS1_SS_22427_01589	SCJLFL3014G01.g	.	ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial	unknown [Zea mays]	.	up (2.96905 , 1.71119)	up (1.84676 , 2.01391)	
GS1_SS_21394_01243	SCQGFL1096H01.g	.	Autonomous transposable element EN-1 mosaic protein; Suppressor-mutator system protein; SPM	hypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group]	.	down (2.17347 , 2.54912)		
GS1_SS_23928_04620	SCJLLR1107A02.g	.	Auxin response factor 22	Auxin response factor 16, putative, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.		down (1.41814 , 1.41716)	

GS1_SS_18033_12465	SCSBST3093E07.g	.	Auxin transporter-like protein 2	putative AUX1-like permease [Oryza sativa Indica Group]	.		down (1.47529 , 1.71238)	
GS1_SS_13048_08838	SCEQRT2091D12.g	.	Barwin	unknown [Zea mays]	.	down (3.05252 , 5.42642)		
GS1_SS_24814_09036	SCAGCL6013C08.g	.	Barwin	unknown [Zea mays]	.	down (2.86791 , 3.13834)		
GS1_AS_11729_01554	SCCART1003E08.g	.	Bifunctional hydroxyisourate hydrolase/2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline decarboxylase; HIU hydrolase; OHCU decarboxylase; Transthyretin-like protein	Os03g0390700 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] hypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group] putative transthyretin, having alternative splicing products [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Transthyretin precursor family protein, exp	yedX; transthyretin-related protein ; K07127	up (3.34035 , 3.65533)		
GS1_SS_25798_08720	SCAGLB2046F01.g	.	Bowman-Birk type bran trypsin inhibitor precursor (Protein RBBI3-3) (RBTI) (OSE727A)	trypsin inhibitor [Zea mays] trypsin inhibitor [Zea mays] unknown [Zea mays]	.	down (1.86219 , 1.81756)		
GS1_SS_16863_11597	SCJFSB1010E03.g	.	C-4 methylsterol oxidase; Methylsterol monooxygenase	unknown [Zea mays]	sterol desaturase family protein	up (1.9 , 1.58997)		
GS1_SS_05992_08269	SCCCLR1024F09.g	.	Calcium-dependent protein kinase isoform AK1 (CDPK)	hypothetical protein OsJ_022254 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.		up (2.90794 , 2.23457)	
GS1_SS_20645_01924	SCCCLR1022F01.g	.	Carbonyl reductase 4	unknown [Zea mays]	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	down (3.36359 , 3.31728)		
GS1_SS_13050_14496	SCBGLR1047G06.g	.	Cation transport regulator-like protein 2	unknown [Zea mays]	ChaC-like family protein ; K07232 cation transport protein ChaC			down (1.71356 , 1.53156)

GS1_SS_03974_02428	SCBFRZ2048D04.g	.	CBL-interacting protein kinase 14; OsCIPK14	unknown [Zea mays]	.			down (1.64947 , 1.89868)
GS1_SS_16877_07928	SCJLLR1106H06.g	.	Cellulose synthase A catalytic subunit 7 [UDP-forming]; OsCesA7	cellulose synthase10 [Zea mays] cellulose synthase catalytic subunit 10 [Zea mays]	.	up (4.69134 , 2.01391)		
GS1_SS_04426_12879	SCRFHR1006G03.g	.	Chemocyanin precursor (Basic blue protein) (Plantacyanin)	unknown [Zea mays]	.		up (2.56685 , 2.28153)	
GS1_SS_18921_12375	SCCCLR2C02D12.g	.	Chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplastic; Light-harvesting complex II protein 5; LHCB5; LHCIIC;	chlorophyll a/b-binding apoprotein CP26 precursor [Zea mays] chlorophyll a/b-binding apoprotein CP26 precursor	.		down (1.93187 , 1.80751)	
GS1_SS_15039_00606	SCUTRZ2008G09.g	.	Citrate-binding protein;	hypothetical protein OsI_036348 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.			down (3.41054 , 3.01049)
GS1_SS_09884_05809	SCVPLR1028E01.g	.	Cytochrome b6-f complex subunit 5; Cytochrome b6-f complex subunit V; Cytochrome b6-f complex subunit petG	cytochrome b6/f complex subunit V [Oryza sativa Indica Group] cytochrome b6/f complex subunit V; petE [Oryza sativa (indica cultivar-group)] cytochrome b6/f complex subunit V; petE [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] cytochrome b6/f complex subunit 5; C	petG; cytochrome b6-f complex subunit 5		down (1.52203 , 2.18859)	

GS1_SS_01693_19773	SCCCRZ1001C12.gSC CCRZ1001C12.g	.	Cytochrome P450 51; CYPLI; P450-LIA1; Obtusifoliol 14-alpha demethylase	cytochrome P450- like protein [Sorghum bicolor]	cytochrome P450 ; K05917 cytochrome P450, family 51, subfamily A (sterol 14-demethylase) [EC:1.14.13.70]	up (1.58557 , 1.43098)		
GS1_SS_15220_12028	SCCCRZ3003H07.g	.	Cytokinin dehydrogenase 7; Cytokinin oxidase 7; CKO7; AtCKX7; AtCKX5	cytokinin dehydrogenase 10 [Zea mays]	.	up (2.04202 , 1.51257)		
GS1_SS_04674_11440	SCQSAD1059A04.g	.	Dehydration- responsive protein RD22;	unknown [Zea mays]	.	up (1.50212 , 1.44493)		
GS1_SS_10433_10146	SCCCLR1065D09.g	.	D-glycerate 3-kinase, chloroplastic; AtGLYK;	unknown [Zea mays]	hypothetical protein		down (1.94396 , 2.01391)	
GS1_SS_24567_11142	SCCCLB1003G10.g	.	Disease resistance response protein 206	unknown [Zea mays]	.	up (1.71238 , 1.37841)		
GS1_SS_01941_08126	SCEPAM1019B10.g	.	DnaJ homolog subfamily C member 2; Zuotin-related factor 1; Mouse Id associate 1; MIDA1	hypothetical protein Osl_008455 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.		down (1.27987 , 1.91853)	down (5.73582 , 4.19887)
GS1_SS_25776_00124	SCSFSD1066G06.g	.	E3 ubiquitin-protein ligase CIP8 (COP1- interacting protein 8)	unknown [Zea mays]	.	up (2.42839 , 1.58777)		down (1.52309 , 2.58471)
GS1_SS_05812_10057	SCCCCL3004A08.b	.	Early nodulin 93; N- 93	unknown [Zea mays]	.	up (6.10504 , 1.53901)	up (4.65893 , 4.05584)	
GS1_SS_02558_09443	SCJLAM1063F08.g	.	Epoxide hydrolase 2; Soluble epoxide hydrolase; SEH; Epoxide hydratase; Cytosolic epoxide hydrolase; CEH	unknown [Zea mays]	putative epoxide hydrolase	up (2.18859 , 1.83401)		
GS1_SS_03092_08416	SCACLR2022B02.g	.	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit; ERF2; ERF-3; ERF3; Translation release factor 3; Polypeptide release factor 3	Zinc knuckle family protein, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	virulence- associated lipoprotein MIA		up (1.37745 , 1.64947)	up (1.68997 , 1.59328)

GS1_SS_05248_02314	SCEZLB1005G10.g	.	Expansin-B17; OsEXPB17; Beta- expansin-17; OsaEXPb1.13;	unknown [Zea mays]	.	down (1.94801 , 2.36199)		
GS1_SS_21848_03892	SCCCLB1023H08.g	.	Expansin-B3; OsEXPB3; Beta- expansin-3; OsaEXPb1.10;	unknown [Zea mays]	.	up (4.08405 , 5.38893)		
GS1_SS_15277_14286	SCACRZ3108C04.g	.	F-box protein At4g18380	Os05g0490300 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] 'unknown protein, contains f- box domain' [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os05g0490300 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] hypothetical protein OsI_019745 [Oryza sativa (indica cultiv	.	up (1.73748 , 1.64832)		
GS1_SS_03391_02201	SCVPAM1057C12.g	.	Formamidase; Formamide amidohydrolase	unknown [Zea mays]	fmdA; formamidase			up (2.25012 , 1.64604)
GS1_SS_12273_06458	SCJFRT1058A06.g	.	Germin-like protein subfamily T member 1 precursor	Os03g0804500 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)] Germin-like protein subfamily T member 1 precursor, putative, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os03g0804500 [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]	oxalate decarboxylase OxdC, putative (EC:4.1.1.2); K01569 oxalate decarboxylase [EC:4.1.1.2]			down (1.44794 , 1.44794)

GS1_SS_21236_03669	SCCCCL7C03G05.g	.	Gibberellin 2-beta-dioxygenase; Gibberellin 2-beta-hydroxylase; Gibberellin 2-oxidase; GA 2-oxidase	hypothetical protein OsI_003721 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.	up (1.67249 , 1.76541)		
GS1_SS_26112_06519	SCSGLV1007A08.g	.	Guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase; Penta-phosphate guanosine-3'-pyrophosphohydrolase; (ppGpp)ase	unknown [Zea mays]	guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase (ppGpp synthase) ; K01139 guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase [EC:3.1.7.2]	down (1.98069 , 1.59881)		
GS1_SS_07068_09635	SCCCLR1022A08.g	.	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4; Nucleolar protein NAP57 homolog; Nopp-140-associated protein of 57 kDa homolog; AtNAP57	Os07g0636000 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] putative centromere/microtubule binding protein [Oryza sativa Japonica Group] Os07g0636000 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] hypothetical protein OsI_026066 [Oryza sativa (indica cultivar-g	putative rRNA pseudouridine synthase (EC:4.2.1.70); K03177 tRNA pseudouridine synthase B [EC:5.4.99.12]		up (1.60103 , 1.5042)	

GS1_SS_03158_01880	SCJFRT1060F02.g	.	Histone H3.3 (H3.2) Histone H3.3 (H3.2) Histone H3.3 (Histone H3.2) Histone H3.3 Histone H3.3 Histone H3.3 (Histone H3.2) (Minor histone H3) Histone H3.3 Histone H3.3 Histone H3.3 Histone H3.3 Histone H3.3 Histone H3.3 (Replacement histone H3)	histone H3.2 [Arabidopsis thaliana]	.	up (1.70173 , 1.68997)		
GS1_SS_24874_01979	SCAGLB2048A06.g	.	Inner membrane ALBINO3-like protein 2, chloroplastic; Ath5;	hypothetical protein OsJ_019466 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	hypothetical protein		down (4.25748 , 3.41054)	
GS1_SS_00075_12059	SCCCAD1004H06.g	.	Inositol-3-phosphate synthase; Myo- inositol-1-phosphate synthase; MI-1-P synthase; IPS	unknown [Zea mays]	.	down (1.7219 , 1.44894)		
GS1_SS_14133_09545	SCVPRT2081C04.g	.	Lactoylglutathione lyase; Methylglyoxalase; Aldoketomutase; Glyoxalase I	hypothetical protein Osl_024032 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	glutathione S- transferase domain- containing protein (EC:2.5.1.18); K00799 glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]			down (5.31474 , 2.82843)

GS1_SS_12139_14303	SCEZLR1009G11.g	.	Lipin-2	lipin, N-terminal conserved region family protein, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] hypothetical protein OsJ_033302 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.		down (4.05584 , 6.32033)	down (3.65533 , 5.73582)
GS1_SS_15947_13890	SCJFRZ3C08E05.g	.	Lysine decarboxylase-like protein At5g11950	unknown [Zea mays]	hypothetical protein ; K06966			down (1.75564 , 1.68063)
GS1_SS_22437_05597	SCVPAM1056A04.g	.	Lysine decarboxylase-like protein At5g11950	unknown [Zea mays]	hypothetical protein ; K06966			down (1.73869 , 1.40639)
GS1_SS_22721_09227	SCVPRZ3028D12.g	.	Monoglyceride lipase; MGL	Os05g0363100 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] putative phospholipase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os05g0363100 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	lysophospholipase		down (1.81756 , 2.77022)	
GS1_SS_22949_13586	SCACHR1039D11.g	.	Multidrug resistance-associated protein 9; Glutathione S-conjugate-transporting ATPase 9; ATP-energized glutathione S-conjugate pump 9	hypothetical protein OsJ_015278 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	multidrug ABC transporter permease/ATPase	down (3.01049 , 1.72429)		

GS1_AS_25416_00587	SCEPSD2005D11.g	.	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit M, chloroplastic; NAD(P)H dehydrogenase I subunit M; NDH-1 subunit M; NDH-M; NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit M, chloroplastic; NAD(P)H dehydrogenase I subunit M; NDH-1 subunit M; NDH-M;	unknown [Zea mays]	NADH dehydrogenase I subunit M ; K05584 NADH dehydrogenase I subunit M [EC:1.6.5.3]		up (3.20428 , 2.53151)	
GS1_SS_07991_11687	SCUTLR2015B12.g	.	NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit; NADH dehydrogenase subunit 7	NADH dehydrogenase subunit 7 [Beta vulgaris subsp. vulgaris] NADH dehydrogenase subunit 7 [Beta vulgaris subsp. vulgaris]	nuoD; NADH dehydrogenase subunit D (EC:1.6.5.3); K00333 NADH dehydrogenase I chain D [EC:1.6.5.3]			up (1.7411 , 1.33422)
GS1_SS_11172_07917	SCUTLR1037C05.g	.	Nectarin-1; Superoxide dismutase [Mn];	germin-like protein 6a [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	oxalate decarboxylase OxdC, putative (EC:4.1.1.2); K01569 oxalate decarboxylase [EC:4.1.1.2]	up (2.20381 , 1.89737)		
GS1_SS_16192_16179	SCRFRZ3056G09.gSC RFRZ3056G09.g	.	Nitrate reductase [NADH]; NR	nitrate reductase [Zea mays]	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding component	down (1.92519 , 1.54007)		
GS1_SS_25685_11811	SCCSD2001G01.g	.	Nitrate/chlorate transporter	unknown [Zea mays]	amino acid/peptide transporter ; K03305 proton-dependent oligopeptide transporter, POT family		down (2.62079 , 4.82323)	
GS1_SS_11262_13810	SCCCLR2004B05.g	.	Non-specific lipid-transfer protein 2; nsLTP2; 7 kDa lipid transfer protein;	unknown [Zea mays]	lysophospholipase		down (2.26577 , 2.11404)	

GS1_SS_12346_13960	SCJFRT1061G09.g	.	Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	hypothetical protein LOC100191759 [Zea mays] unknown [Zea mays]	metallophosphoesterase		up (1.5252 , 1.47019)	
GS1_SS_22268_13525	SCRLFL3006B12.g	.	OPA3-like protein	Os02g0312500 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] unknown protein [Oryza sativa Japonica Group] Os02g0312500 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.		down (1.9602 , 1.76908)	
GS1_SS_15421_08959	SCEPRZ3085A12.g	.	Peroxidase 1;	unknown [Zea mays]	.	up (2.12874 , 1.49692)		
GS1_SS_07881_07151	SCVPLB1020D03.g	.	Peroxidase 12; Atperox P12; PRXR6; ATP4a;	unknown [Zea mays]	adenylate/guanylate cyclase ; K01768 adenylate cyclase [EC:4.6.1.1]	up (1.56808 , 1.9292)		
GS1_SS_01478_11822	SCQGLR2032G02.g	.	Peroxidase 15; Prx15; Anionic peroxidase;	unknown [Zea mays] unknown [Zea mays]	.		down (16.5642 , 2.12874)	
GS1_SS_20572_02586	SCSFSB1105B01.g	.	Peroxidase 2;	hypothetical protein OsJ_005854 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.	down (1.82134 , 2.37841)		
GS1_SS_16427_12392	SCSBRZ3124E02.g	.	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 1; AtPIP5K1; 1-phosphatidylinositol-4-phosphate kinase 1; PtdIns(4)P-5-kinase 1; Diphosphoinositide kinase 1	unknown [Zea mays]	putative phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase	up (2.73208 , 1.9711)		

GS1_SS_11883_02678	SCMCRT2086A02.g	.	Phosphoribosylamine-glycine ligase, chloroplastic; Glycinamide ribonucleotide synthetase; GARS; Phosphoribosylglycinamide synthetase;	hypothetical protein Osl_036507 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	purD; phosphoribosylamine--glycine ligase (EC:6.3.4.13); K01945 phosphoribosylamine--glycine ligase [EC:6.3.4.13]	up (4.05584 , 2.09943)		
GS1_SS_26239_14098	SCUTAD1033G05.g	.	Phytochrome-interacting factor 5 (Basic helix-loop-helix protein 65) (bHLH 65) (AtbHLH065) (Phytochrome interacting factor-like 6)	transcription factor BHLH9-like protein [Oryza sativa Japonica Group] transcription factor BHLH9-like protein [Oryza sativa Japonica Group]	.	up (5.02805 , 2.47942)		
GS1_SS_13139_06873	SCJFRZ1007G02.g	.	Polyamine oxidase;	unknown [Zea mays]	amine oxidase		down (3.73213 , 5.77572)	
GS1_SS_07900_04108	SCJFRZ3C07B07.g	.	Probable calcium-binding protein CML29 (Calmodulin-like protein 29)	unknown [Zea mays]	.			down (1.63467 , 1.38607)
GS1_SS_24489_14281	SCQGRT1038H03.g	.	Probable carbohydrate esterase At4g34215	unknown [Zea mays]	protein of unknown function DUF303, acetyl esterase putative	up (2.42839 , 1.62225)		
GS1_SS_09110_10359	SCEQLB1064H09.g	.	Probable FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 2, chloroplast precursor (PPIase) (Rotamase)	hypothetical protein Osl_029064 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; K01802 peptidylprolyl isomerase [EC:5.2.1.8]	down (1.9292 , 2.09943)		
GS1_SS_08444_10240	SCSBHR1053H06.g	.	Probable glutathione S-transferase GSTU6; 28 kDa cold-induced protein	unknown [Zea mays]	glutathione S-transferase-like protein		down (1.99861 , 1.98069)	
GS1_SS_21523_09567	SCBFAM2025E12.g	.	Probable inositol oxygenase; Myo-inositol oxygenase; MI oxygenase	unknown [Zea mays]	inositol oxygenase (EC:1.13.99.1); K00469 inositol oxygenase [EC:1.13.99.1]		down (3.20428 , 3.05252)	

GS1_SS_20549_08802	SCEQSB1019B09.g	.	Probable L-ascorbate peroxidase 8, chloroplastic; OsAPx08;	Os02g0553200 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Probable L-ascorbate peroxidase 8, chloroplastic; OsAPx08; thylakoid-bound ascorbate peroxidase [Oryza sativa Japonica Group] Os02g0553200 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.	up (1.53156 , 1.39474)		
GS1_SS_04915_09055	SCRLSB1041B09.g	.	Probable NADP-dependent oxidoreductase P1	unknown [Zea mays]	alcohol dehydrogenase, zinc-containing ; K07119			up (1.84548 , 1.48555)
GS1_SS_03238_02452	SCSFAM1076F04.g	.	Probable potassium transporter 16; OsHAK16	hypothetical protein OsJ_011049 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	kup, trkD; Kup family low affinity potassium transporter ; K03549 KUP system potassium uptake protein	down (2.01391 , 1.59881)		
GS1_SS_22805_08816	SCQSHR1022H06.g	.	Probable sulfate transporter 3.4	unknown [Zea mays]	sulfate permease	up (2.42839 , 1.51362)		
GS1_SS_18486_08015	SCBFST3136C07.g	.	Profilin-A	Os10g0323600 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os10g0323900 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Profilin-A profilin A [Oryza sativa] Profilin A [Oryza sativa] Profilin A [Oryza sativa] Profilin A, putative, expressed [Oryza sativa (japoni	.	up (2.07053 , 1.80751)		

GS1_SS_18068_00686	SCQSST1040D05.g	.	Protein FAM136A	Os11g0256200 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] expressed protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] expressed protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os11g0256200 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.			up (2.25012 , 1.6358)
GS1_SS_24569_10121	SCQGRT3043F06.g	.	Protein FBL4	hypothetical protein OsJ_033051 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	yetJ; hypothetical protein ; K06890		up (1.37554 , 2.20381)	
GS1_SS_23439_08318	SCUTFL3071B06.g	.	Protein GOS9 Protein GOS9	hypothetical protein Osl_021073 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.			down (13.4543 , 7.06162)
GS1_SS_00610_06745	SCJLLR1103F02.g	.	Protein phosphatase 2C AIP1; PP2C AIP1; Protein AKT1-INTERACTING 1	unknown [Zea mays]	.		down (1.8163 , 2.04202)	
GS1_SS_21633_09324	SCVPLB1018H01.g	.	Protein regulator of cytokinesis 1	unknown [Zea mays]	.	up (13.2691 , 18.0009)		
GS1_SS_10125_06806	SCCCLR1072D05.g	.	Protein RUPTURED POLLEN GRAIN 1	unknown [Zea mays]	.		up (4.22807 , 2.11404)	
GS1_SS_25697_04120	SCCCRT1002G01.g	.	Protein SSM1	unknown [Zea mays]	hydrolase, haloacid dehalogenase-like family ; K07025 putative hydrolase of the HAD superfamily			down (1.78633 , 1.52098)

GS1_SS_17843_10825	SCJLST1027H02.g	.	Protein STIP1 homolog	putative stress-inducible protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] TPR Domain containing protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] hypothetical protein OsJ_011626 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	TPR repeat-containing protein		down (2.01391 , 1.71713)	
GS1_SS_10549_10737	SCBGLR1002E05.g	.	Protein TIFY 10A; Jasmonate ZIM domain-containing protein 1	hypothetical protein LOC100191257 [Zea mays] unknown [Zea mays]	.		up (1.98481 , 2.51403)	
GS1_SS_17554_00845	SCCCRZ1003H05.g	.	Purple acid phosphatase; Zinc(II) purple acid phosphatase;	hypothetical protein OsJ_028507 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	hypothetical protein		down (1.38992 , 1.41323)	
GS1_SS_13167_14096	SCEZRT2015D11.g	.	Putative AC transposase; ORFA	hAT family dimerisation domain containing protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.		down (1.73027 , 3.13834)	
GS1_SS_14157_02689	SCVPRT2083F11.g	.	Putative AC transposase; ORFA	Os06g0605100 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os06g0605100 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.		down (4.22807 , 5.81589)	

GS1_SS_25505_04897	SCSBSD2032E05.g	.	Putative disease resistance protein RGA1 (RGA3-blb)	Os12g0438300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] NB-ARC domain containing protein, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os12g0438300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] hypothetical protein OsJ_034562 [Oryza sativa (japonica c	.	down (2.54912 , 1.55401)		
GS1_SS_15815_02345	SCRLLR1038G05.g	.	Putative F-box/FBD/LRR-repeat protein At5g22610	hypothetical protein OsJ_034764 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.			down (1.6644 , 1.5977)
GS1_SS_14877_04587	SCJFRZ2013H01.g	.	Putative glutaredoxin-C5	unknown [Zea mays]	.		up (1.35191 , 1.36131)	
GS1_SS_21034_04042	SCEPSB1131A04.g	.	Putative membrane protein ycf1	Ycf1 [Lemna minor] Ycf1 [Lemna minor] Putative membrane protein ycf1 Ycf1 [Lemna minor] Ycf1 [Lemna minor]	.	down (1.65634 , 1.77276)		

GS1_SS_03616_08745	SCQGLR1088C06.g	.	Putative monocopper oxidase; Skewed roots;	Os06g0104300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] putative Bplo [Oryza sativa Japonica Group] Os06g0104300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] hypothetical protein OsI_020551 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] hypothetical protein OsJ_01	.	up (1.98343 , 2.60268)		
GS1_SS_14348_11363	SCBFRZ2017G05.g	.	Putative monocopper oxidase; Skewed roots;	Os10g0508000 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] putative pollen specific protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] putative ascorbate oxidase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] multi-copper oxidase type I family protein, putative [	.		down (1.40834 , 1.79378)	
GS1_SS_09711_14019	SCAGLR1064F07.g	.	Putative nuclear matrix constituent protein 1-like protein; NMCP1-like	hypothetical protein OsI_003804 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	chromosome segregation protein SMC ; K03529 chromosome segregation protein		up (1.88165 , 1.39088)	
GS1_SS_13502_01727	SCJLRT2051G08.g	.	Putative pleiotropic drug resistance protein 7	hypothetical protein OsI_006190 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.	down (2.02792 , 2.15846)		

GS1_SS_15715_13770	SCEPRT2043F09.g	.	Putative protease Do-like 14	hypothetical protein OsJ_003555 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.	down (2.12874 , 1.58557)	down (3.09513 , 2.73208)	
GS1_SS_03110_08851	SCCCLB1003H11.g	.	Putative protein ABIL2; Abl interactor-like protein 2	Os01g0551800 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Putative protein ABIL2; Abl interactor-like protein 2 Abl tyrosine kinase-interacting-like protein [Oryza sativa Japonica Group] Os01g0551800 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] hypothetical	.		down (1.45902 , 1.59881)	
GS1_SS_20281_12127	SCQGRT1040E09.g	.	Putative tropinone reductase homolog At1g07440	unknown [Zea mays]	tropinone reductase (EC:1.1.1.206); K08081 tropine dehydrogenase [EC:1.1.1.206]	down (1.58118 , 1.55186)		
GS1_SS_12011_14550	SCEQRT1024C07.g	.	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump; Pyrophosphate-energized inorganic pyrophosphatase; H(+)-PPase	proton translocating pyrophosphatase [Oryza sativa]	hppA; membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase (EC:3.6.1.1); K01507 inorganic pyrophosphatase [EC:3.6.1.1]	up (6.9163 , 2.77022)		
GS1_SS_00546_12088	SCMCCL6049E02.g	.	Pyrrolidone-carboxylate peptidase; 5-oxopropyl-peptidase; Pyroglutamyl-peptidase I; PGP-I; Pyrase	unknown [Zea mays]	pyrrolidone-carboxylate peptidase (EC:3.4.19.3); K01304 pyroglutamyl-peptidase [EC:3.4.19.3]	up (1.63467 , 1.44693)		

GS1_SS_07710_10743	SCUTLR1037D02.g	.	Pyrrolidone-carboxylate peptidase; 5-oxoprolyl-peptidase; Pyroglutamyl-peptidase I; PGP-I; Pyrase	unknown [Zea mays]	pyrrolidone-carboxylate peptidase (EC:3.4.19.3); K01304 pyroglutamyl-peptidase [EC:3.4.19.3]	up (1.52838 , 1.74352)		
GS1_SS_14764_07308	SCCCRZ2C01E03.g	.	RAG1-activating protein 1	unknown [Zea mays]	.		up (1.57571 , 1.4025)	
GS1_SS_20315_10910	SCCCLR1024B10.g	.	Retinol dehydrogenase 11; Retinal reductase 1; RalR1; Prostate short chain dehydrogenase/reductase 1; Androgen-regulated short-chain dehydrogenase/reductase 1; HCV core-binding protein HCBP12	unknown [Zea mays]	short-chain dehydrogenase/reductase SDR		down (1.32409 , 1.37364)	
GS1_SS_00536_05784	SCRFLR1034A11.g	.	Retinol dehydrogenase 12	unknown [Zea mays]	short-chain dehydrogenase/reductase SDR			down (1.58667 , 1.92252)
GS1_SS_25656_12097	SCSBLB1036F05.g	.	Senescence-associated protein DIN1	unknown [Zea mays]	rhodanese-like domain-containing protein	up (2.78949 , 2.58471)		
GS1_SS_26284_05683	SCBFRZ2048F01.g	.	Ser/Thr-rich protein T10 in DGCR region	unknown [Zea mays]	hypothetical protein	up (3.09513 , 2.02792)		
GS1_SS_16236_12202	SCEZLR1052D09.g	.	Sperm-associated antigen 1; Infertility-related sperm protein Spag-1; HSD-3.8	unknown [Zea mays]	M50 family peptidase			up (1 , 1)
GS1_SS_25481_14374	SCACSD2018E08.g	.	Stem 28 kDa glycoprotein precursor (Vegetative storage protein A)	unknown [Zea mays]	acid phosphatase class B	up (2.31338 , 4.56306)		

GS1_SS_10186_07079	SCCCLR1C03C11.g	.	Sugar phosphate exchanger 2; cAMP-inducible protein 2; Solute carrier family 37 member 2	hypothetical protein OsI_016348 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	glpT; glycerol-3-phosphate transporter; K02445 MFS transporter, OPA family, glycerol-3-phosphate transporter		down (1.5768 , 1.71119)	
GS1_SS_14117_08299	SCCCCL4003F01.g	.	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5; TR-AP; Tartrate-resistant acid ATPase; TrATPase; Acid phosphatase 5, tartrate resistant;	unknown [Zea mays]	acid phosphatase (EC:3.1.3.2)		down (1.30949 , 1.70291)	
GS1_SS_08150_13607	SCUTLR1058D05.g	.	Thioredoxin-like 1	unknown [Zea mays]	trxA4; thiol-disulfide isomerase and thioredoxins ; K03671 thioredoxin 1			down (2.12874 , 1.51152)
GS1_SS_11573_09279	SCRFLR2038G09.g	.	Thiosulfate sulfurtransferase; Rhodanese; Senescence-associated protein; Sulfurtransferase protein 16; AtStr16	unknown [Zea mays]	rhodanese-like domain-containing protein	up (2.62079 , 1.66324)		
GS1_SS_10611_12176	SCCCRZ1004C04.g	.	Titin; D-Titin; Kettin	hypothetical protein OsJ_005104 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	MJ0042 family finger-like protein		down (2.28153 , 1.35379)	
GS1_SS_15314_13970	SCCCRZ2C03F12.g	.	Tubulin alpha-1 chain (Alpha-1-tubulin)	unknown [Zea mays]	.			down (1.98206 , 1.49174)

GS1_SS_18676_07921	SCJFRZ1006E06.g	.	Tubulin beta-3 chain (Beta-3-tubulin)	Tubulin beta-3 chain (Beta-3-tubulin) beta-tubulin R2242 [Oryza sativa Japonica Group] beta-tubulin R2242 [Oryza sativa Japonica Group] hypothetical protein OsI_023272 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] hypothetical protein OsJ_021467 [Oryza sati	.		down (1.49796 , 1.72668)	
GS1_SS_00319_12530	SCQSHR1023D08.g	.	Two-component response regulator ARR18	unknown [Zea mays]	.		down (2.46229 , 2.14355)	down (3.63008 , 3.09513)
GS1_SS_13921_13907	SCEQRT2027H09.g	.	Uncharacterized glycosyltransferase AGO61;	Os01g0118400 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] putative HGA6 [Oryza sativa Japonica Group] putative HGA6 [Oryza sativa Japonica Group] Os01g0118400 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	capsular polysaccharide biosynthesis protein-like protein		down (15.6707 , 24.761)	
GS1_SS_16143_11343	SCQGRT1040E11.g	.	Uncharacterized membrane protein C2G11.09	Os01g0534900 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] putative ERD4 protein [Oryza sativa Japonica Group] Os01g0534900 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.	up (1.69819 , 1.57243)		

GS1_SS_23772_11629	SCCCFL5062H06.g	.	Uncharacterized mscS family protein At1g78610	hypothetical protein Osl_008239 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.		up (1.27987 , 1.64376)	
GS1_SS_03582_12195	SCQGLR1085C12.g	.	Uncharacterized protein At2g34160	unknown [Zea mays]	.	down (2.12874 , 2.62079)		
GS1_SS_12202_05428	SCQSRT1035G12.g	.	Universal stress protein A-like protein	Os10g0437500 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] universal stress protein family protein, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os10g0437500 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] hypothetical protein OsJ_030403 [Oryza sativa (jap	UspA	up (18.2522 , 2.37841)		
GS1_SS_02551_00867	SCCCLR1072C02.g	.	Universal stress protein A-like protein	unknown [Zea mays]	hypothetical protein	up (1.46206 , 1.44293)		
GS1_SS_13937_06884	SCQSST1037D10.g	.	Universal stress protein A-like protein	unknown [Zea mays]	hypothetical protein	up (7.21 , 1.47121)		
GS1_SS_22733_00407	SCRFAM2127C07.g	.	UPF0016 membrane protein sll0615	unnamed protein product [Vitis vinifera]	hypothetical protein	down (2.36199 , 1.94262)		
GS1_SS_00453_00482	SCJFRZ2012G04.g	.	Vacuolar transporter chaperone 2; Phosphate metabolism protein 1	unknown [Zea mays]	.		down (1.66786 , 1.35004)	
GS1_SS_07546_00754	SCEQRT2101A04.g	.	Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1 homolog	unknown [Zea mays]	.	up (2.02792 , 1.43197)	down (1.54971 , 2.08493)	
GS1_SS_24840_12283	SCJLRT3077D08.g	.	YTH domain family protein 2	unknown [Zea mays]	.		down (1.92119 , 2.65737)	
GS1_SS_07954_05548	SCJFHR1C03G04.g	.	Zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein 5; OsSAP5	AN12 [Zea mays] AN12 [Zea mays] unknown [Zea mays]	.	up (1.87125 , 1.87514)		

GS1_SS_22303_20747	SCRLFL3008G06.b	Amino acid metabolism	Alpha 1,3-fucosyltransferase	unknown [Zea mays]	.	down (2.58471 , 1.62902)		
GS1_SS_01287_15883	SCJFRZ2029B03.g	Amino acid metabolism	CTP synthase (EC 6.3.4.2) (UTP--ammonia ligase) (CTP synthetase)	unknown [Zea mays]	CTP synthetase (EC:6.3.4.2); K01937 CTP synthase [EC:6.3.4.2]	up (1.91587 , 1.55401)		
GS1_SS_07897_15170	SCJFHR1034E06.g	Amino acid metabolism	histidyl-tRNA synthetase	unknown [Zea mays]	hisS; histidyl-tRNA synthetase (EC:6.1.1.21); K01892 histidyl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.21]	down (1.5977 , 1.93724)		
GS1_SS_06851_15580	SCRLCL6031A08.g	Amino acid metabolism	L-asparaginase	H0212B02.13 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] OSIGBa0113E10.3 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] hypothetical protein OsI_017064 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	asparaginase family protein; K01424 L-asparaginase [EC:3.5.1.1]		up (2.39496 , 2.69447)	
GS1_SS_16822_18941	SCCCST2004A03.g	Amino acid metabolism	Shikimate kinase, chloroplast precursor (EC 2.7.1.71)	unknown [Zea mays]	aroK; shikimate kinase (EC:2.7.1.71); K00891 shikimate kinase [EC:2.7.1.71]	up (2.28153 , 1.3632)		
GS1_SS_13619_18216	SCMCRT2103F09.g	Bioenergetics	Cytokinin-O-glucosyltransferase 2 (Zeatin O-glucosyltransferase 2) (AtZOG2) (UDP-glucosyl transferase 85A1)	gb AAF17077.1 UDP-glucose glucosyltransferase [Sorghum bicolor]	.			down (2.41162 , 3.65533)

GS1_SS_26118_19348	SCSBSD2029H02.g	Bioenergetics	Ferredoxin-1, chloroplastic; Ferredoxin I; Fd I;	sp P27787 FER1_M AIZE Ferredoxin I, chloroplast precursor (Fd I) pir T03286 ferredoxin [2Fe-2S] - maize gb AAA33459.1 ferredoxin gb AAA33460.1 ferredoxin prf 1907324B ferredoxin:ISOTYP E=I	petF1; ferredoxin I ; K02639 ferredoxin		down (1.4651 , 1.64947)	
GS1_SS_09690_11296	SCAGLR1043F05.g	Calcium Metabolism	Calcineurin B-like	unknown [Zea mays]	.	up (1.62789 , 2.02792)		
GS1_SS_14031_15728	SCEQHR1082B01.g	Carbohydrate metabolism	Beta-glucosidase isozyme 2 precursor (EC 3.2.1.23)	hypothetical protein Osl_030804 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	bglA; beta-glucosidase ; K05350 beta-glucosidase [EC:3.2.1.21]		down (1.43098 , 1.8226)	
GS1_SS_01034_18262	SCCCRZ1002E05.g	Carbohydrate metabolism	Carbon fixation	Pyruvate kinase EC 2.7.1.40	pykF; pyruvate kinase ; K00873 pyruvate kinase [EC:2.7.1.40]	up (2.8481 , 1.86477)		
GS1_SS_12435_15164	SCRLSB1044F02.g	Carbohydrate metabolism	Carbon fixation	Ribose phosphate isomerase EC 5.3.1.6	rpiA; ribose 5-phosphate isomerase A (EC:5.3.1.6); K01807 ribose 5-phosphate isomerase A [EC:5.3.1.6]		down (1.58008 , 1.37459)	
GS1_SS_23004_21055	SCSGHR1066C03.b	Carbohydrate metabolism	chalcone synthase	Chalcone synthase 5; Naringenin-chalcone synthase 5 chalcone synthase 5 [Sorghum bicolor]	naringenin-chalcone synthase (EC:2.3.1.74); K00660 chalcone synthase [EC:2.3.1.74]		up (1.74957 , 2.49666)	
GS1_SS_25394_21770	SCBGRT1050A08.g	Carbohydrate metabolism	Chitinase (EC 3.2.1.14)	hypothetical protein Osl_033349 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	chitinase (EC:3.2.1.14)	down (1.82387 , 1.82134)		

GS1_SS_16841_18244	SCUTST3086G11.g	Carbohydrate metabolism	chlorophyll a/b binding protein (CAB)	unknown [Zea mays]	.		down (1.31768 , 1.33886)	
GS1_SS_05259_21833	SCCCCL4004G06.g	Carbohydrate metabolism	Citrate cycle (TCA cycle)	Phosphoenolpyruvate carboxykinase EC 4.1.1.32	pckA; phosphoenolpyruvate carboxykinase (EC:4.1.1.49); K01610 phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) [EC:4.1.1.49]		up (1.24833 , 1.37268)	
GS1_SS_15288_15569	SCCCCL6004H07.g	Carbohydrate metabolism	Galactose metabolism	beta-Galactosidase EC 3.2.1.23	putative beta-galactosidase			up (2.14355 , 1.64832)
GS1_SS_05991_14906	SCCCLR1001E06.g	Carbohydrate metabolism	Glycolysis/Gluconeogenesis	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase EC 1.2.1.12	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC:1.2.1.12); K00134 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [EC:1.2.1.12]	up (1.51572 , 1.9602)		
GS1_SS_19281_20818	SCQGFL4071E04.g	Carbohydrate metabolism	N metabolism	glutamine synthetase	glnA2; glutamine synthetase ; K01915 glutamine synthetase [EC:6.3.1.2]	down (2.12874 , 2.54912)		
GS1_SS_07807_18115	SCQGFL1095D09.g	Carbohydrate metabolism	neutral invertase	neutral invertase-like protein [Oryza sativa Japonica Group] neutral invertase-like protein [Oryza sativa Japonica Group]	neutral invertase			down (1.60325 , 1.35379)

GS1_SS_08764_21659	SCCCST2003C12.g	Carbohydrate metabolism	Pentose and Glucuronate interconversions	Alcohol dehydrogenase(NA DP+) EC 1.1.1.2	formaldehyde dehydrogenase (glutathione) (EC:1.2.1.1); K00001 alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]; K00121 S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase [EC:1.1.1.284]	up (5.46416 , 2.31338)		
GS1_SS_13647_16802	SCCCLR2001H05.g	Carbohydrate metabolism	Pentose and Glucuronate interconversions	Alcohol dehydrogenase(NA DP+) EC 1.1.1.2	formaldehyde dehydrogenase (glutathione) (EC:1.2.1.1); K00001 alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]; K00121 S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase [EC:1.1.1.284]	up (6.77396 , 3.43426)		
GS1_SS_24520_21449	SCACHR1038E08.g	Carbohydrate metabolism	Pentose and Glucuronate interconversions	Mannitol dehydrogenase (cytochrome) EC 1.1.2.2	alcohol dehydrogenase ; K00002 alcohol dehydrogenase (NADP+) [EC:1.1.1.2]		down (1.79129 , 2.41162)	
GS1_SS_02065_19705	SCCCCL5004G07.g	Carbohydrate metabolism	Pentose and Glucuronate interconversions	Polygalacturonase EC 3.2.1.15	galacturan 1,4-alpha-galacturonidase (EC:3.2.1.67); K01213 galacturan 1,4-alpha-galacturonidase [EC:3.2.1.67]	up (2.65737 , 2.47942)		
GS1_SS_11104_18718	SCSGLR1025B11.g	Carbohydrate metabolism	Pentose and Glucuronate interconversions	Polygalacturonase EC 3.2.1.15	hypothetical protein		down (1.43197 , 1.52944)	

GS1_SS_01426_21879	SCSGAD1009E08.g	Carbohydrate metabolism	Photosynthesis	ATP synthase delta chain (atp-delta-thylakoid ATPase)	atpH; ATP synthase delta chain; K02113 F-type H ⁺ -transporting ATPase delta chain [EC:3.6.3.14]	down (1.77892 , 2.08493)		
GS1_SS_25938_20117	SCBGLR1044D06.g	Carbohydrate metabolism	Photosynthesis	ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (RuBisCO) activase	ribulose biphosphate carboxylase, small chain ; K01602 ribulose-biphosphate carboxylase small chain [EC:4.1.1.39]	down (2.71321 , 1.65749)		
GS1_SS_20438_20605	SCJLLR1103A10.g	Carbohydrate metabolism	Putative 32.7 kDa jasmonate-induced protein	hypothetical protein OsI_036610 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	jacalin-related lectin		up (2.18859 , 1.72907)	
GS1_SS_15768_19034	SCUTLR1037C07.g	Carbohydrate metabolism	Putative alpha-galactosidase	unknown [Zea mays]	agaB2; putative alpha-galactosidase (EC:3.2.1.22); K07407 alpha-galactosidase [EC:3.2.1.22]		down (1.6358 , 1.33607)	
GS1_SS_11888_21143	SCCCLR1076C07.g	Carbohydrate metabolism	Putative beta-1,3-glucanase	unknown [Zea mays]	.			down (1.48349 , 1.57026)
GS1_SS_05729_16932	SCCCCL3001E05.b	Carbohydrate metabolism	SIP homologue (AKIN beta)	interacts with the SNF1 complex	.	up (1.59549 , 1.45397)		
GS1_SS_05765_17065	SCCCCL3002B11.b	Carbohydrate metabolism	Starch and sucrose metabolism	Alpha amylase EC 3.2.1.1	cytoplasmic alpha-amylase (EC:3.2.1.1); K01176 alpha-amylase [EC:3.2.1.1]	up (5.46416 , 2.04202)		
GS1_SS_05498_17977	SCUTAM2089E05.g	Carbohydrate metabolism	Starch and sucrose metabolism	Beta-Amylase EC 3.2.1.2	amyB; beta-amylase (EC:3.2.1.2)	up (2.2974 , 1.56049)		

GS1_SS_01270_18061	SCCCLR2C02H01.g	Carbohydrate metabolism	Starch and sucrose metabolism	Cellulose synthase (UDP-forming) EC 2.4.1.12	glycosyl transferase group 2 family protein ; K00694 cellulose synthase (UDP-forming) [EC:2.4.1.12]	up (7.1602 , 2.23457)		
GS1_SS_05712_19612	SCCCCL2001H04.b	carbohydrate metabolism	trehalose metabolism	Trehalose-6-phosphate synthase	EC:3.1.3.1 22.4.1.15			down (1.6358 , 1.46003)
GS1_SS_12045_19144	SCEQLB1067F01.g	Carbohydrate metabolism	vegetative storage protein	provável relação com fermentos e assimilação de nitrogênio	phosphorylase family protein ; K01243 S-adenosylhomocysteine nucleosidase [EC:3.2.2.9]; K01244 5'-methylthioadenosine nucleosidase [EC:3.2.2.16]	down (2.71321 , 5.85634)	down (1.48041 , 2.31338)	
GS1_SS_03025_20848	SCCCLB1001E04.g	Carbohydrate metabolism	vegetative storage protein (acid phosphatase)	unknown [Zea mays]	acid phosphatase class B			down (1.80876 , 2.09943)
GS1_SS_07367_19801	SCCCCL4006H09.g	Cell cycle	expansin	unknown [Zea mays]	.		down (1.68529 , 1.79378)	
GS1_SS_06720_17873	SCMCCL6053C09.g	Cell cycle	peptide transport protein homolog	Os01g0871500 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os01g0871500 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	amino acid/peptide transporter ; K03305 proton-dependent oligopeptide transporter, POT family		up (1.39765 , 1.28165)	
GS1_SS_12059_18725	SCEQRT1027G12.g	Development	development	bifunctional nuclease [Zinnia elegans]	S1/P1 nuclease	up (1.85575 , 2.25012)		
GS1_SS_25518_18146	SCBFSD2035E11.g	Development	FLOWERING LOCUS T protein	ZCN14 protein [Zea mays] ZCN14 [Zea mays] ZCN14 [Zea mays]	.	down (1.92252 , 2.75108)		
GS1_SS_25789_20294	SCEPSD1070F02.g	Development	FLOWERING LOCUS T protein	ZCN15 protein [Zea mays] ZCN15 [Zea mays] ZCN15 [Zea mays]	.	down (2.07053 , 2.28153)		up (3.5801 , 2.63902)
GS1_SS_15917_17654	SCUTAM2088C05.g	development	senescence-associated protein	ERD7 protein	.			down (1.66671 , 1.51152)
GS1_SS_24926_20825	SCEZLR1009E06.g	hormone biosynthesis	ethylene	ACC oxidase	EC:1.14.17.4	up (2.32947 , 1.37745)		down (1.93053 , 1.51572)

GS1_SS_20498_19027	SCJFRT1007H07.g	hormone biosynthesis	jasmonic acid	Lipoxygenase	EC1.13.11.12	up (3.65533 , 2.36199)		
GS1_SS_21695_20802	SCCART1001E01.g	hormone biosynthesis	jasmonic acid	Lipoxygenase	EC1.13.11.12	up (2.36199 , 1.43893)	up (2.56685 , 2.34567)	
GS1_AS_18588_14956	SCEQRT1024E12.g	hormone biosynthesis	salicylic acid	Phenylalanine ammonia-lyase	EC4.3.1.5	down (2.18859 , 2.88786)		
GS1_SS_16618_20274	SCCCLR1048D07.g	hormone biosynthesis	salicylic acid	Phenylalanine ammonia-lyase	EC4.3.1.5	up (3.01049 , 1.499)		
GS1_SS_05762_18529	SCCCCL3002B05.b	hormone-related	auxin	auxin-responsive GH3 family protein	.			down (1.53794 , 1.48452)
GS1_SS_01464_21708	SCRLLR1038D05.g	hormone-related	jasmonic acid	jasmonate responsive	.		up (2.36199 , 1.58777)	
GS1_AS_13554_15741	SCMCRT2087B03.g	Inositol	Inositol phosphatases	1,4,5-trisphosphate 5-Phosphatase	.	down (2.04202 , 2.9897)		
GS1_SS_01828_19341	SCCCAM1C01F03.g	Inositol	others	inositol o-methyltransferase	O-methyltransferase	up (3.94493 , 3.86375)		
GS1_SS_13319_20910	SCJFRT1007F09.g	Inositol	others	inositol o-methyltransferase	O-methyltransferase, family protein 2	up (5.50217 , 2.01391)		
GS1_SS_15082_17000	SCUTRZ2024G10.g	Inositol	others	Phospholipase C	.		down (2.63902 , 2.39496)	
GS1_SS_04508_08190	SCMCAM2083F04.g	Library-specific	By domain	C2H2	.			down (1.58227 , 1.40639)
GS1_SS_19871_14817	SCSGFL1079D12.g	lipid metabolism	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase; Cyclopropane fatty acid synthase; CFA synthase Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase; Cyclopropane fatty acid synthase; CFA synthase	Cyclopropane fatty acid synthase	EC:2.1.1.79		down (1.67714 , 2)	
GS1_SS_15053_18095	SCCCRZ2C02C08.g	Lipid, fatty-acid and isoprenoid metabolism	Acyl carrier protein I, chloroplast precursor (ACP I)	hypothetical protein LOC100193006 [Zea mays] unknown [Zea mays]	acpP; acyl carrier protein (EC:3.1.26.3); K02078 acyl carrier protein	down (1.64262 , 1.49071)		
GS1_SS_08936_21690	SCVPLR2012E03.g	Lipid, fatty-acid and isoprenoid metabolism	Inositolphosphorylceramide-B C-26 hydroxylase (EC 1.-.-.) (IPC-B hydroxylase)	unknown [Zea mays]	fatty acid hydroxylase	up (3.68075 , 2.32947)		

GS1_SS_08457_17376	SCCART1002E01.g	Lipid, fatty-acid and isoprenoid metabolism	Putative stearyl-acyl carrier protein desaturase	unknown [Zea mays]	acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase (EC:1.14.19.-); K03921 acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase [EC:1.14.19.2]	up (7.88986 , 2.65737)		
GS1_AS_25569_19905	SCBFSD2038H10.g	No matches	.	.	.	up (2.94854 , 1.54649)		
GS1_SS_07358_21397	SCUTHR1063G08.g	No matches	.	.	.		up (1.36226 , 1.43396)	
GS1_SS_13124_20300	SCEQRT2098E08.g	No matches	.	.	.		down (2.02792 , 1.82893)	
GS1_SS_22098_20006	SCSBFL1035B08.g	No matches	.	.	.		up (1.60882 , 1.94531)	
GS1_SS_25961_16238	SCQGSD1048C09.g	No matches	.	.	.	down (1.92252 , 1.96837)		
GS1_SS_26100_18557	SCSGFL5C08C02.g	No matches	.	Os07g0666200 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os07g0666200 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.		down (8.87656 , 8.22491)	
GS1_SS_06747_17352	SCMCCL6055A01.g	No matches	.	unknown [Zea mays]	.			up (3.11666 , 1.68296)
GS1_SS_09664_02008	SCCCLR1C11C06.g	No matches	.	unknown [Zea mays]	.	down (2.34567 , 1.36131)		
GS1_SS_10268_15875	SCCCLR2C01F04.g	No matches	.	unknown [Zea mays]	.		down (5.57897 , 13.1775)	
GS1_SS_14381_05008	SCCCRZ1004C02.g	No matches	.	unknown [Zea mays]	.			down (2.56685 , 2.01391)
GS1_AS_13663_20137	SCMCRT2108A07.g	No matches	non-coding	.	.	up (2 , 1.78139)		
GS1_SS_00442_15120	SCCCRZ2C04G07.g	No matches	non-coding	.	.		down (1.4025 , 1.35943)	
GS1_SS_04564_21611	SCUTAM2005B05.g	No matches	non-coding	.	.		up (3.70635 , 2.73208)	
GS1_SS_10689_17050	SCEQLR1050C05.g	No matches	non-coding	.	.		up (2 , 1.68179)	
GS1_SS_10881_18008	SCCCLR1C08D01.g	No matches	non-coding	.	.	up (2.04202 , 3.11666)		
GS1_SS_17141_18080	SCUTRZ3106F01.g	No matches	non-coding	.	.		up (4.34694 , 2.04202)	

GS1_SS_15665_06471	SCJFRZ3C01H11.g	No matches	Nucleoside diphosphate kinase 2, chloroplastic; Nucleoside diphosphate kinase II; NDP kinase II; NDPK II; NDK II;	unknown [Zea mays]	.	down (1.71713 , 1.61776)		
GS1_SS_09241_18534	SCEZLB1013H04.g	Nucleic acid metabolism	Nucleotide metabolism	Adenine phosphoribosyltransferase	adenine phosphoribosyltransferase ; K00759 adenine phosphoribosyltransferase [EC:2.4.2.7]			down (1.62563 , 1.74594)
GS1_SS_04693_20843	SCJFLR1071B03.g	Nucleic acid metabolism	Nucleotide metabolism	Adenosine-5'-phosphosulfate kinase	adenylyl-sulfate kinase (EC:2.7.1.25); K00860 adenylylsulfate kinase [EC:2.7.1.25]	up (1.98069 , 1.64376)		
GS1_SS_12317_14614	SCAGLR1043F07.g	Nucleic acid metabolism	Nucleotide metabolism	Putative brown planthopper-induced resistance protein 1	SCJ12.22; hypothetical protein		down (1.96156 , 2.62079)	
GS1_AS_18286_16094	SCVPST1061F07.g	Nucleic acid metabolism	Nucleotide metabolism	Putative inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	putative nucleoside hydrolase protein (EC:3.2.2.-); K01249 DNA glycosylase [EC:3.2.2.-]		up (1.68063 , 1.93589)	
GS1_SS_13487_20028	SCEQRT1024H10.g	pathogenicity	protease inhibitor	Pathogenesis-related protein 5/thaumatococcus related	thaumatin pathogenesis-related protein	down (2.05623 , 2.04202)		
GS1_SS_08400_14365	SCVPLR1028H01.g	Pathogenicity	Protease inhibitor	thaumatin	.		up (1.76541 , 1.84933)	
GS1_SS_25693_18364	SCJLRT2051G07.g	Pathogenicity	Protease inhibitors	Thaumatococcus	putative secreted protein	down (1.69937 , 4.28709)		
GS1_SS_24533_16308	SCJFST1017E10.g	pathogenicity	R-gene	caneRpg1-7 (stem rust resistance)	protein kinase		down (1.6358 , 1.54542)	
GS1_SS_25924_20845	SCSFSD2066G04.g	pathogenicity	R-gene	caneXa21-3	hypothetical protein	down (2.21914 , 1.9)		
GS1_SS_25104_18296	SCRULB2063B12.g	pathogenicity	R-gene	NADPH HC toxin reductase	EC:1.1.1.219		down (22.4711 , 22.6274)	down (2.32947 , 3.45815)
GS1_AS_21406_15936	SCSBAD1126D07.g	pathogenicity	R-gene	NBS-LRR	.	down (2.31338 , 2.37841)		

GS1_SS_20026_19283	SCRLFL1014B12.gSC RLFL1014B12.g	pathogenicity	R-gene	NBS-LRR	.		down (1.85446 , 1.90264)	
GS1_SS_15850_21344	SCEZRZ1015F03.g	Pathogenicity	R-genes	With LRR	.	up (1.70527 , 1.50733)	up (1.43197 , 1.32042)	
GS1_SS_23879_20577	SCSBFL1106G08.g	Pathogenicity	R-genes transduction	LSD1	.	up (3.70635 , 1.96428)		
GS1_SS_25734_15387	SCSBSD1058E09.g	Photosynthesis	light harvesting	Early light-inducible protein ELIP	.	down (2.46229 , 1.84676)		
GS1_SS_08582_19866	SCACLR1129A11.g	Photosynthesis	Photosystem I reaction centre subunit N, chloroplast precursor (PSI-N)	Water stress repressed	.		down (1.26313 , 1.37745)	
GS1_SS_20473_17303	SCAGFL1086E09.g	Photosynthesis	Photosystem II 22 kDa protein, chloroplast precursor (CP22)	Water stress repressed	.		down (1.66555 , 1.87905)	
GS1_AS_04710_17097	SCEPLB1044E07.g	Protein kinase	cell cycle-related	caneCDC2-3	EC:2.7.11.22	down (3.78423 , 2.44528)		
GS1_SS_16073_15411	SCMCRZ3067A10.g	Protein kinase	MAPK/MAPKK/MAPK KK	caneNPK1-6	.			down (1.71238 , 1.91853)
GS1_SS_17983_17532	SCEZRZ1012E04.g	Protein kinase	other	caneG11A kinase-6	EC:2.7.1.37	up (1.93187 , 1.5305)		
GS1_SS_08364_18789	SCVPST1060B01.g	Protein kinase	other	caneNIMA-1 (never in mitosis gene a) related kinase	EC:2.7.11.-	up (2.92817 , 1.77892)		
GS1_SS_07500_19045	SCMCST1049H07.gSC MCST1049H07.g	Protein kinase	putative RLCK	caneRLCK-DIX1	EC:2.7.1.-	up (2.96905 , 1.58008)		
GS1_SS_05071_21089	SCEPRZ1009C10.g	Protein kinase	SNF-like kinase	caneOsmotic stress- activated protein kinase-1	EC:2.7.11.-		down (1.31403 , 1.51047)	
GS1_SS_15036_14199	SCCCRZ2C01F06.g	Protein kinase	Undefined	caneUPK-18	serine/threonine protein kinase			up (5.27803 , 1.9602)
GS1_SS_08700_17136	SCAGLR1064H08.g	Protein metabolism	41 kDa chloroplast nucleoid DNA binding protein (CND41)	ST3>ST1	.	up (1.73267 , 1.64947)		
GS1_SS_08584_20664	SCCCRZ2C03C05.g	Protein metabolism	Chaperone protein dnaJ	unknown [Zea mays]	DnaJ protein ; K03686 molecular chaperone DnaJ			down (2 , 1.44293)
GS1_SS_16843_15376	SCCCCL3120G07.g	protein metabolism	chaperonin	HSP70 (heat shock) (Calmodulin-binding protein)	KO:K03283	up (2.78949 , 1.76663)		

GS1_SS_24924_16478	SCJFRZ2009E12.g	Protein metabolism	subtilase family protein	hypothetical protein Osl_030760 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	protease-associated PA domain protein		up (1.93992 , 1.65405)	
GS1_SS_01463_17788	SCCCCL3005D01.b	protein phosphatase	serine/threonine PPM family	PP2C Catalytic Subunit	EC:3.1.3.16			down (1.71713 , 1.51887)
GS1_SS_17276_20176	SCEPRZ1010E06.g	protein phosphatase	serine/threonine PPM family	PP2C-like	EC:3.1.3.16			down (1.5966 , 1.34723)
GS1_SS_08308_10681	SCQSHR1024G09.g	Receptor	Receptor Ser/Thr kinase	cane S-receptor-43	serine/threonine kinase protein ; K08884 serine/threonine protein kinase, bacterial [EC:2.7.11.1]		up (2.2974 , 1.70173)	
GS1_SS_01814_00696	SCSGHR1067C04.g CSGHR1067C04.g	receptor	receptor Ser/Thr kinase	caneRLK-DV3 (LRR)	leucine-rich repeat-containing protein	up (2.69447 , 1.90132)		
GS1_SS_04669_18524	SCVPCL6041G02.g	receptor	receptor Ser/Thr kinase	caneRLK-DVIII3 (LRR)	two component regulator			down (3.01049 , 1.80375)
GS1_SS_11103_18809	SCSGLR1025B10.g	receptor	receptor Ser/Thr kinase	caneSHR5 receptor-2	protein kinase; K08884 serine/threonine protein kinase, bacterial [EC:2.7.11.1]		down (4.50023 , 5.38893)	
GS1_SS_04468_02731	SCMCAM2082C07.g	receptor	receptor Ser/Thr kinase	caneSHR5 receptor-3	protein kinase; K08884 serine/threonine protein kinase, bacterial [EC:2.7.11.1]	up (1.61217 , 1.53475)	down (2.51403 , 2.15846)	down (2.26577 , 3.29436)
GS1_SS_09229_20221	SCEZLB1013C12.g	receptor	receptor Ser/Thr kinase	caneWAK-11 (wall-associated kinase)	protein kinase, putative ; K08884 serine/threonine protein kinase, bacterial [EC:2.7.11.1]	down (1.56266 , 1.61217)		
GS1_SS_39962_14836	SCSGFL4196H05.g	Receptors	Receptor Ser/Thr kinase	cane RLK with lectin domain-31	.	down (1.73989 , 1.76296)		
GS1_SS_07877_21256	SCQGLB1040B05.g	Secondary metabolism	beta-glucosidase aggregating factor precursor	hypothetical protein LOC100192837 [Zea mays] unknown [Zea mays]	jacalin-related lectin	down (2.34567 , 1.98894)		

GS1_SS_12529_20983	SCAGST3140F06.g	Secondary metabolism	cold-induced glucosyl transferase	hypothetical protein OsJ_021002 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	glycosyl transferase family protein		down (1.57462 , 1.94127)	
GS1_SS_40822_16569	SCRURT3061A09.g	Secondary metabolism	putative anthocyanidin synthase	unknown [Zea mays]	2OG-Fe(II) oxygenase family oxidoreductase	up (6.1475 , 2.34567)		
GS1_SS_24868_18833	SCRURT2007A09.g	Secondary metabolism	putative glutathione S transferase	Os01g0371500 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] putative glutathione transferase [Oryza sativa Japonica Group] putative glutathione transferase [Oryza sativa Japonica Group] Os01g0371500 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] hypothetical pro	gst10; glutathione S-transferase, putative (EC:2.5.1.18); K00799 glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]	down (2.37841 , 2.82843)		
GS1_SS_20499_17914	SCSGFL1078F07.g	Secondary metabolism	TPA: putative anthocyanidin reductase	hypothetical protein LOC100191338 [Zea mays] unknown [Zea mays]	NAD-dependent epimerase/dehydratase ; K00091 dihydroflavonol-4-reductase [EC:1.1.1.219]		down (1.6358 , 1.97247)	down (3.18215 , 2.65737)
GS1_AS_18974_18897	SCCCRT2001H11.g	small GTPase	ARF (ADP-ribosylation factor)	ARF1	KO:K07977		up (2.08493 , 2.82843)	
GS1_SS_18008_02489	SCJLRZ1024A07.g	small GTPase	GTPase modulator	Rac GDP-dissociation inhibitor	.		down (2.26577 , 2.75108)	
GS1_SS_01095_20796	SCSGHR1069F04.b	stress	cytochrome P450	CYP71C4	EC:1.14.-.-	up (2.2974 , 2.09943)		
GS1_SS_20738_18502	SCRUAD1064C10.g	stress	cytochrome P450	CYP75A6 (flavonoid 3'-hydroxylase)	EC:1.14.-.-	up (3.13834 , 3.05252)		
GS1_SS_19713_17588	SCEZHR1087F06.g	stress	cytochrome P450	CYP84A1 (ferulate-5-hydroxylase)	EC:1.14.-.-	up (1.60659 , 1.56266)		
GS1_SS_11161_19643	SCQGLR1085F11.g	stress	drought-induced	Dehydrin	.			up (4.53154 , 3.20428)

GS1_SS_07642_16466	SCEZHR1048H09.g	stress	infected library	CLC-d chloride channel/anion channel protein	KO:K05393			down (1.96973 , 1.64376)
GS1_SS_00007_14861	SCCAD1001C08.g	stress	peroxidase	P7X	EC:1.11.1.7			up (2.46229 , 1.42208)
GS1_SS_08597_20430	SCAGLR2011H07.g	stress	thioredoxin	Thioredoxin	trxA-2; thioredoxin (TrxA-2) ; K03671 thioredoxin 1		down (1.5252 , 1.35566)	
GS1_SS_11286_19433	SCCCLR2C01F06.g	stress	wound-induced	wound-responsive family protein	.	up (11.1579 , 1.65176)		down (2.8481 , 2.73208)
GS1_SS_14292_18605	SCCCLR1022B07.g	Stress response	abscisic acid- and stress-induced protein - rice	ST3>ST1	.		down (3.29436 , 2.86791)	
GS1_SS_14939_21284	SCJFRZ2030D03.g	Stress response	Cytochrome P450	Cyp only	cyc2; cytochrome P450 CYP262A1 (EC:1.14.-.-)	down (5.09824 , 6.02099)		
GS1_SS_04460_20636	SCQSRT1036E09.g	Stress response	Cytochrome P450	Cyp98A	ga3			up (1.59992 , 1.55509)
GS1_SS_18615_21390	SCJLHR1029E03.g	Stress response	DNA repair	Tyrosine aminotransferase	aminotransferase class I and II ; K10907 aminotransferase [EC:2.6.1.-]			up (1.82513 , 1.35755)
GS1_AS_13171_21052	SCJLRT1023A03.g	Stress response	response to oxidative stress	Glutathione peroxidase 1	glycoside hydrolase, family 9	up (2.69447 , 2.02792)		
GS1_SS_10599_19832	SCCCLR1C03A09.g	Stress response	response to oxidative stress	Peroxidase (Fragment)	.	up (2.15846 , 2.20381)		
GS1_SS_11794_19787	SCCART1C06H06.g	Stress response	response to oxidative stress	Peroxidase 50 precursor (Atperox P50) (PRXR2) (ATP9a)	.	up (1.70527 , 1.42208)		
GS1_SS_23002_16704	SCCCFL4090D02.g	Stress response	response to pathogenic fungi	Dirigent protein, putative (Hypothetical protein) (At1g58170)	.	down (1.78633 , 1.45095)		
GS1_SS_13093_20865	SCEQRT1033F06.g	Stress response	Water stress	induced	gi 12325237 gb AA G52567.1 putative peptide transporter		down (1.81252 , 1.75078)	
GS1_SS_11693_17692	SCCCLR2C03F01.g	Stress response	Water stress	induced	gi 21595294 gb AA M66088.1 nonspecific lipid-transfer protein	up (1.51047 , 1.5977)		
GS1_SS_14330_16273	SCEZRZ1014A06.g	Stress response	Water stress	induced	gi 30697236 ref NP_200756.2 haloacid dehalogenase-like		down (1.31403 , 1.54756)	

GS1_SS_07751_16813	SCQSHR1023B08.g	Transcription Factor	AP2/EREBP	DREB1	.	up (2.04202 , 2.53151)		
GS1_SS_00602_19470	SCJFAD1C12A04.b	Transcription Factor	AP2/EREBP	EREBP	.	up (2.21914 , 1.64262)		
GS1_SS_09843_18601	SCBGLR1023H03.g	Transcription Factor	AP2/EREBP	EREBP	.	up (1.68763 , 1.45498)		
GS1_SS_06324_18757	SCCCCL4002B07.g	Transcription Factor	AP2/EREBP	EREBP	thermosome subunit		up (1.34537 , 1.61776)	
GS1_SS_05808_20247	SCCCCL3003H02.b	Transcription Factor	Aux/IAA	unknown [Zea mays]	.	up (2.05623 , 1.97247)		
GS1_SS_21139_20692	SCMCAM2083C07.g	Transcription Factor	Aux/IAA	unknown [Zea mays]	.	up (2.58471 , 1.74715)		
GS1_SS_33378_21782	SCVPRZ3029B05.g	Transcription Factor	Aux/IAA	unknown [Zea mays]	.		up (1.57899 , 1.51677)	
GS1_SS_04474_08617	SCCCCL4005C09.gSCCCCL4005C09.g	Transcription Factor	bZIP	RISBZ4/G/HBF-1-related	.			down (1.83655 , 1.72429)
GS1_SS_02373_15529	SCJFAM1066B05.g	Transcription Factor	HIT (histidine triad)	Protein kinase C inhibitor	KO:K02503	down (1.97657 , 1.83528)		
GS1_SS_05544_19640	SCCCRT1C05E01.g	Transcription Factor	HLH	Os03g0135700 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] basic helix-loop-helix, putative, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os03g0135700 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.		down (4.22807 , 4.14106)	
GS1_SS_04722_07806	SCCCLR1076F07.g	Transcription Factor	HLH (helix-loop-helix)	Helix-loop-helix protein 1A	.	up (1.6245 , 1.41519)		
GS1_SS_13130_21695	SCEQRT2091B01.g	Transcription Factor	Homeobox	unknown [Zea mays]	.		down (1.73027 , 1.60436)	
GS1_SS_07042_18864	SCEQRT2093D08.g	Transcription Factor	hormone-related/auxin/Aux/IAA	Auxin-responsive protein IAA12	.	up (1.6358 , 2.39496)		
GS1_SS_23522_14785	SCEPLR1008A10.g	Transcription Factor	hormone-related/auxin/Aux/IAA	Auxin-responsive protein IAA31	.	up (2.46229 , 1.73027)		
GS1_SS_01266_20694	SCACHR1038D01.g	Transcription Factor	hormone-related/ethylene/AP2/EREBP	BTH-induced ERF transcriptional factor 4/ethylene-responsive element-binding protein	.	up (4.56306 , 2.11404)	down (1.48968 , 1.89605)	

GS1_SS_09825_19084	SCBGLR1003D10.g	Transcription Factor	Leucine zipper	hypothetical protein OsJ_015962 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.	down (3.50642 , 3.34035)		
GS1_SS_10468_09222	SCJFLR1056A04.g	Transcription Factor	MADS	m31 protein [Zea mays] m31 [Zea mays] unknown [Zea mays]	.		up (3.20428 , 7.3615)	
GS1_SS_23134_21365	SCCCFL6003A11.g	Transcription Factor	MADS	MADS box protein	.		up (1.99032 , 1.67365)	
GS1_SS_23287_18307	SCCCFL4003G08.g	Transcription Factor	MADS	transcription factor MADS32/floral homeotic protein APETALA	.		up (2.09943 , 1.78139)	
GS1_SS_10322_21635	SCCCLR1C05B03.g	Transcription Factor	MYB	Myb-related protein Zm38	.	up (2.17347 , 1.44794)		
GS1_SS_11653_21205	SCUTLR2030B11.g	Transcription Factor	Others	HSF	.			down (1.50838 , 1.805)
GS1_SS_00977_19566	SCEZRT2023C02.g	Transcription Factor	Others	RAV-like	.	up (2.2974 , 3.83706)		
GS1_SS_13692_17423	SCQSRT2033A08.g	Transcription Factor	WRKY	TPA: TPA_exp: WRKY transcription factor 45 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] WRKY transcription factor 45 [Oryza sativa] hypothetical protein OsI_018773 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.		up (2.01391 , 2.41162)	
GS1_SS_12705_18561	SCQGRT1044D10.g	Transcription Factor	WRKY	WRKY transcription factor 10 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	.	down (2.02792 , 1.94396)		
GS1_SS_17385_19291	SCBGLR1023D10.g	Transcription Factor	Zinc finger proteins	GATA	.		down (1.69937 , 1.38415)	

GS1_SS_21718_20427	SCEPRZ1008D05.g EPRZ1008D05.g	Transporters	(Q9ATN1) NOD26-like membrane integral protein ZmNIP3-1	NOD26-like membrane intrinsic protein3 [Zea mays] Aquaporin NIP3-1; NOD26-like intrinsic protein 3-1; ZmNIP3-1; ZmNIP3;1 NOD26-like membrane integral protein ZmNIP3-1 [Zea mays]	major intrinsic protein ; K06188 aquaporin Z	down (1.77399 , 1.94936)		
GS1_SS_05864_20064	SCCCCL3080B09.b	Transporters	ABC transporter (ABC_tran)	unknown [Zea mays]	.		up (10.4107 , 8.1681)	
GS1_SS_09912_17924	SCBGLR1098E05.g	Transporters	ABC transporter transmembrane region (ABC_membrane)	putative multidrug resistance-associated protein 7 [Oryza sativa Japonica Group]	multidrug ABC transporter permease/ATPase		down (2.32947 , 1.71238)	
GS1_SS_12253_18189	SCEQRT1030C03.g	Transporters	K+ potassium transporter	unknown [Zea mays]	K+ potassium transporter; K03549 KUP system potassium uptake protein	up (1.78881 , 1.42109)		
GS1_SS_04528_17056	SCJFRZ2025E05.g	Transporters	Major intrinsic protein (MIP)	hypothetical protein Osl_037535 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.		up (1.37745 , 1.3435)	
GS1_SS_01040_14561	SCCCLR1076A02.g	Transporters	Nucleoside transporter (Nucleoside_tran)	unknown [Zea mays]	.	up (1.72788 , 1.65864)		
GS1_SS_19384_17901	SCVPLR2012F07.g	Transporters	POT family (PTR2) - putative nitrate transporter	unknown [Zea mays]	amino acid/peptide transporter ; K03305 proton-dependent oligopeptide transporter, POT family			down (1.72788 , 1.43694)

GS1_SS_12316_17514	SCEPRT2043E12.g	Transporters	Sulfate transporters (Sulfate_transp)	Os03g0161200 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Sulfate transporter 3.1, putative, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] Os03g0161200 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	sulfate permease			down (1.67365 , 1.47939)
GS1_SS_17430_19886	SCEQRT1030B05.g	Transporters	Transmembrane amino acid transporter protein (Aa_trans)	unknown [Zea mays]	.		down (1.37173 , 1.50733)	
GS1_SS_08110_16284	SCBGLR1118B02.g	two component relay	response regulator (ARR-like)	Response regulator 7	response regulator receiver modulated diguanylate cyclase/phosphodiesterase			down (1.70645 , 1.9292)
GS1_AS_08241_18815	SCQGHR1013F05.g	Ubiquitination	F-box protein	unknown [Zea mays]	hypothetical protein	down (3.78423 , 2.09943)		
GS1_SS_16600_21832	SCJFRZ2025E01.g	Unknown protein	.	.	.		up (1.57571 , 1.79626)	
GS1_SS_23572_17077	SCQGFL4079E03.g	unknown protein	.	hypothetical protein Osl_034029 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	.			down (3.24901 , 1.67133)
GS1_SS_23726_14330	SCRLFL4059G07.g	Unknown protein	.	P0660F12.15 [Oryza sativa Japonica Group]	.		down (16.5642 , 10.7779)	
GS1_SS_14170_20378	SCCCRZ1001A09.g	unknown protein	.	unknown [Zea mays]	.			down (2.25012 , 1.35473)
GS1_SS_23593_19757	SCJLFL3018D01.g	unknown protein	.	unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	.		down (8.63383 , 8.75435)	
GS1_SS_16029_16619	SCUTLR1037G05.g	Unknown protein	Putative GTP-binding protein	unknown [Zea mays]	.		up (1.72788 , 2.2974)	

total	up	down	inside
172	64	108	0
221	142	79	0
78	21	57	0
14	13	15	0
17	8	26	0
2	2	4	0
15	17	13	0